

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciências de Alimentos

*Degradação de dioxinas e furanos policlorados por fungos
basidiomicetos ligninolíticos e sua aplicação em processo de
biorremediação*

Msc. Márcia Freire Dos Reis Gorny, bióloga

Tese apresentada ao Curso de Pós – Graduação, em
Ciências de Alimentos, da Faculdade de Engenharia de
Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, como
requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª Lucia Regina Durrant

Campinas

Fev/2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

G681d Gorny, Márcia Freire dos Reis
Degradação de dioxinas e furanos policlorados por fungos
basidiomicetos ligninolíticos e sua aplicação em processo de
biorremediação / Márcia Freire dos Reis Gorny. – Campinas, SP:
[s.n.], 2005.

Orientador: Lucia Regina Durrant
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Dioxina - Toxicologia. 2.Furanos. 3.Biorremediação.
4.Toxicidade. I.Durrant, Lucia Regina. II.Universidade
Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III.Título.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Lucia Regina Durrant
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Ranulfo Montealegre
Universidade Estadual de Campinas

Prof.^a Dr.^a Andréa Roberta Clemente
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Anderson Guerra
Universidade de São Paulo

Prof.^a Dr.^a Fabiana André Falconi
UNIOESTE

SUPLENTES

Prof. Dr. Alexandre Nunes Ponezzi
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Hamilton Roberto Fortes Bavutti
Universidade São Judas Tadeu

Campinas, _____ de _____ de _____ 2005.

*“Ainda que teus passos pareçam inúteis, vai abrindo caminhos,
como a água que desce cantando da montanha...Outros te seguirão”.*

(Saint – Exúpery)

Pelo incansável apoio, incentivo e carinho, dedico mais essa vitória aos meus eternos amores: minha mãe Diva, meu marido Alexandre...e ao meu pai João, que mesmo estando lá do outro lado, está sempre presente me passando muita energia !

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela luz que sempre me guia, não me deixando hesitar e nem desistir diante dos momentos difíceis.

À FAPESP, que com a concessão da bolsa e auxílios complementares, propiciou-me a realização deste trabalho.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Lucia Regina Durrant, pela oportunidade, pela amizade, pelos ensinamentos essenciais para execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fabio Augusto (IQ/UNICAMP), pela grande colaboração e sugestões, que com certeza, fizeram a diferença.

Aos membros da banca examinadora pelas correções e sugestões preciosas para a finalização deste trabalho.

À técnica Ana Cláudia pelo suporte, amizade e as histórias... que me divertiram tanto durante esses anos.

A todos colegas do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana pelas valiosas dicas, colaboração e força, em especial, Ani, Andréa, Eliane, Fabiana's, Luciana, Rose, Claudinha, Ísis e Cristiano.

Aos colegas do Laboratório de Cromatografia Gasosa (IQ/UNICAMP) pela impagável cooperação, pelos muitos ensinamentos e pelo bom humor, em especial, Rogério, Ana Maria e Alexandre....não poderia me esquecer também da Raquelzinha, Carlinhos e Ana Lucia pelos momentos de descontração.

Aos demais funcionários do Departamento de Ciências de Alimentos, os pequenos, mas indispensáveis trabalhos, em especial, Marquinhos, Ricardo, Marcão, Jardete.

Ao pessoal do “Massa Crítica” (São Paulo – Campinas), em especial aos motoristas Sr. Sérgio e Silva, por não me deixarem perder o ônibus, pela dedicação e absoluto bom humor....e pelos amigos Ana Paula, Fabiana, Milena, Edison's sem vocês essa viagem não teria o mesmo brilho.....e energia positiva.....

À minha família, pela torcida e vibração, em especial, aos meus irmãos Adail, Décio, Mércia e Neil, a minhas cunhadas Adriana, Lana, Rita, aos meus adorados sobrinhos Luciana,

Mariana, Ana Luiza, Amanda, Filipi, Fernando e Marcelinha, a minha prima Dilza e aos meus tios Dulce, Arthur, Sílvia e Dínis.....o meu muito obrigada!

ÍNDICE GERAL

LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 BIODERIVAÇÃO DE PCDD/Fs.....	7
2.1.1 Enzimas Ligninolíticas produzidas por microrganismos.....	9
2.1.1.1 Lignina Peroxidase (LiP; E.C. 1.11.1.7).....	11
2.1.1.2 Manganês Peroxidase (MnP; E.C. 1.11.1.7).....	12
2.1.1.3 Lacases (Benzenediol: oxigênio oxidoreductase; E.C. 1.10.3.2).....	13
2.2 BIOSURFACTANTES E SUA APLICAÇÃO EM PROCESSOS DE BIORREMEDIÇÃO.....	16
2.3 BIOMONITORAMENTO.....	17
2.4 CONTAMINAÇÃO DOS ALIMENTOS COM PCDD/Fs.....	20
2.5 CONTAMINAÇÕES DE PCDD/FS OCORRIDAS NO BRASIL.....	21
2.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	22
3 OBJETIVOS.....	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1 CINZAS.....	24
4.2 REAGENTES.....	24
4.3 PRÉ-TRATAMENTO DAS CINZAS COM ÁCIDO CLORÍDRICO.....	25
4.4 EXTRAÇÃO ULTRASSÔNICA DE PCDD/Fs.....	25

4.5 MICRORGANISMOS	25
4.6 MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....	26
4.7 PRÉ- SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS	26
4.7.1 Preparo do inóculo.....	26
4.7.2 Crescimento em meio sólido.....	26
4.8 SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....	26
4.8.1 Crescimento em meio líquido contendo cinzas	26
4.9 DETERMINAÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS	28
4.9.1 Atividade da Lignina Peroxidase	28
4.9.2 Atividade da Manganês Peroxidase	28
4.9.3 Atividade da Lacase.....	28
4.10 DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE	29
4.10.1 Avaliação da sensibilidade das sementes aos PCDD/Fs.....	29
4.10.2 Bioensaio com sementes de alface	29
4.10.3 Dose – resposta utilizando sementes de alface	30
4.11 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE.....	30
4.12 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO DIBENZOFURANO	30
4.12.1 Solução estoque de dibenzofurano.....	31
4.13 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE PCDD/FS E REMOÇÃO DE METAIS PESADOS.	31
4.14 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)	31
4.14.1 Tempo de equilíbrio da extração.....	33
4.15 ANÁLISE DO DIBENZOFURANO POR CROMATOGRAFIA GASOSA.....	33
4.16 ANÁLISE DE PCDD/FS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA EM ESPECTRÔMETRO DE MASSA (CG/EM) DE ALTA RESOLUÇÃO.....	33
4.16.1 Análise por CG/EM	33

4.17 ANÁLISE DE METAIS PESADOS.....	34
4.17.1 Mercúrio	34
4.17.2 Demais Metais	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	35
5.1 DETERMINAÇÃO DE PCDD/FS NAS AMOSTRAS DE CINZAS.....	35
5.2 PRÉ-SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....	37
5.3 SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....	41
5.3.1 Crescimento e produção de enzimas lignolíticas	41
5.3.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE	48
5.3.2.1 Sensibilidade das sementes	48
5.3.2.2 Dose – resposta utilizando sementes de alface.....	50
5.3.2.3 Avaliação da toxicidade das amostras tratadas com os fungos pré-selecionados.....	52
5.3.3 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE.....	56
5.4 CRESCIMENTO DO <i>Pleurotus</i> sp CCB 068 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PCDD/FS.....	60
5.4.1 Produção de enzimas ligninolíticas.....	60
5.4.2 Toxicidade do meio de cultivo.....	63
5.5 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO DIBENZOFURANO.....	65
5.5.1 Microextração Em Fase Sólida (SPME).....	65
5.5.2 Crescimento do <i>Pleurotus</i> sp. 068 em meio contendo dibenzofurano.....	66
5.6 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE PCDD/FS.....	67
5.7 REDUÇÃO DE METAIS PESADOS.....	70
6 CONCLUSÕES.....	74
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 Características do Incinerador e do lixo tratado.....	24
Tabela 4.2 Composição do Meio Líquido Básico em 1L de água destilada, pH final de 5,0...	27
Tabela 4.3 Condições do Espectrômetro de Massas.....	34
Tabela 5.1 Homólogos de dioxinas e furanos presentes na cinza, determinados por CG/EM de alta resolução e seus respectivos TEQs.....	36
Tabela 5.2 Fatores Tóxicos Equivalentes (I-TEFs).....	37
Tabela 5.3 Atividade de LiP (U/L) determinada durante 42 dias de cultivo das 7 linhagens em meio líquido contendo 50 g/L e 70g/L de cinzas.	43
Tabela 5.4 Atividade de MnP (U/L) determinada durante 42 dias de cultivo das 7 linhagens em meio líquido contendo 50g/L e 70g/L de cinzas	45
Tabela 5.5 Atividade de Lacase (U/L) determinada durante 42 dias de cultivo das 7 linhagens em meio líquido contendo 50g/L e 70g/L de cinzas.....	47
Tabela 5.6 Comprimento das radículas de sementes (cm) medido após 42 horas (cm).....	49
Tabela 5.7 Efeito fitotóxico (%) determinado para amostras coletadas com as linhagens pré-selecionadas e amostras sem tratamento (controle abiótico).....	54
Tabela 5.8. Tensão superficial (mN/m) determinada nas amostras dos sobrenadantes coletados após 3, 7, 14 e 21 dias de cultivo das 7 linhagens pré-selecionadas	56
Tabela 5.9. Efeito fitotóxico (%) determinado para sobrenadantes coletados durante 42 dias de cultivo do <i>Pleurotus</i> sp CCB068 em meio líquido contendo diferentes quantidades de cinzas.....	64
Tabela 5.10. Efeito fitotóxico (%) determinado para cinzas (sedimento) coletadas durante 42 dias de cultivo do <i>Pleurotus</i> sp CCB068 em meio líquido contendo diferentes quantidades de cinzas	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Estrutura química do dibenzo- <i>p</i> -dioxinas, PCDD, (A) e dibenzofuranos policlorados, PCDDF, (B).....	4
Figura 2.2 Estrutura modelo proposta por E. Adler	10
Figura 2.3 Ciclo catalítico da lignina peroxidase.....	12
Figura 2.4 Ciclo catalítico da manganês peroxidase.....	13
Figura 2.5 Representação de uma reação catalisada por lacase	14
Figura 4.1 Procedimento básico para microextração em fase sólida: a. <i>headspace</i> ; b. amostra; c. aplicador; d. fibra extratora; e. entrada de gás de arraste e f. coluna cromatográfica. A = Extração; e B = dessorção. 1 = Saturação do <i>headspace</i> ; 2 = perfuração do septo do frasco de amostra; 3 = exposição da fibra de SPME/ extração dos analitos; 4 = retração da fibra para o interior da agulha hipodérmica; 5 = perfuração do septo do injetor do GC (ou introdução da agulha na interface SPME/HPLC); 6 = exposição da fibra/dessorção dos analitos; e, 7 = retração da fibra para o interior da agulha.....	32
Figura 5.1 Placa contendo meio MA e cinzas, sem inóculo.....	38
Figura 5.2 Crescimento de <i>Pleurotus</i> sp 016, após 7 dias em meio MA (A) meio MA contendo cinzas (B) e meio MA contendo extratos de cinzas (C).....	38
Figura 5.3 Crescimento de <i>Lentinus edodes</i> , após 7 dias em meio MA contendo cinzas (A), meio MA (B)e meio MA contendo extrato de cinzas (C).....	39
Figura 5.4 Crescimento de <i>Pleurotus tailandia</i> após 7 dias em meio meio MA (A), meio MA contendo cinzas(B) e meio MA contendo extratos de cinzas (C).....	40
Figura 5.5 Crescimento dos fungos após 5 dias em meio líquido contendo sais minerais e 3,5 g de cinzas. (A) =, <i>P. sp.</i> BCCB068 (B) = <i>P.tailandia</i> ; (C) = <i>P. sajor caju</i> 020; (D) =controle abiótico.....	41
Figura 5.6 Dose – resposta obtida para sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i>) semeadas em diferentes concentrações de dibenzofurano.....	50
Figura 5.7 Efeito fitotóxico em sementes de aface obtido com diferentes diluições do sobrenadante do controle abiótico contendo 70 g/L de cinzas	54

Figura 5.8 Enzimas ligninolíticas produzidas por <i>Pleurotus</i> sp 068 crescido em diferentes quantidades de cinzas (70 g/L; 90 g/L; 130 g/L; 170 g/L e 210 g/L). (A) Produção da Lacase, (B). Produção da LiP e (C) Produção da MnP.....	62
Figura 5.9 Curva de equilíbrio de extração em SPME do dibenzofurano.....	65
Figura 5.10 Degradação do dibenzofurano por <i>Pleurotus</i> sp 068 monitorado durante 28 dias de cultivo.....	66
Figura 5.11. Porcentagem de degradação de PCDD/Fs feita em cinzas após 7 e 64 dias de tratamento do fungo <i>Pleurotus</i> sp CCB068. TCDD = tetaclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina, PeCDD = pentaclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina, HxCDD= Hexaclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina, HpCDD = heptaclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina, OCDD = octaclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina, TCDF= tetraclorodibenzofurano, PeCDF = pentaclorodibenzofurano, HxCDF= hexaclorodibenzofurano, HpCDF = heptaclorodibenzofurano, OCDF = octaclorodibenzofurano.....	68
Figura 5.12 Determinação de metais pesados em amostras tratadas por <i>Pleurotus</i> sp CCB068 e amostras controles após 7 e 64 dias de experimento. (A) Sobrenadante, (B) Cinzas	72

LISTA DE ABREVIATURAS

PCDD/Fs: dibenzo-*p*-dioxinas e dibenzofuranos policlorados

HAPs: hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

PCBs: bifenilos policlorados

POPs : Poluentes orgânicos persistentes

PCDDs: dibenzo-*p*-dioxinas policloradas

PCDFs: dibenzofuranos policlorados

2,3,7,8- TCDD: 2,3,7,8 tetraclorodibenzo-*p*-dioxina

EPA: Environmental Protection Agency

USEPA: United States Environmental Protection Agency

EC: European Community

WHO: World Health Organization

TEFs: Fatores de Equivalência Tóxica

I-TEQ: Equivalente Tóxico Internacional

CBzs: clorobenzenos

2,3,7,8,-TCDF: 2,3,7,8- tetraclorodibenzofurano

LiP: lignina peroxidase

MnP: manganês peroxidase

AAO: álcool aril oxidase

DF: dibenzofurano

DD: dibenzo-*p*-dioxina

OCDD: octaclorodibenzo-*p*-dioxina

MO: Matéria orgânica

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HCH: hexaclorociclohexano

SPME: microextração em fase sólida

CG: cromatógrafo gasoso

FID: detector de ionização de chama

CG/EM: cromatografia gasosa acoplada por espectrofotometria de massa

ICP-OES: Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma de Argônio Induzido

TCDD: tetraclorodibenzo- *p* –dioxina

PeCDD: pentaclorodibenzo- *p* –dioxina

HxCDD: Hexaclorodibenzo- *p* –dioxina

HpCDD: heptaclorodibenzo- *p* –dioxina

TCDF: tetraclorodibenzofurano

PeCDF: pentaclorodibenzofurano

HxCDF: hexaclorodibenzofurano

HpCDF: heptaclorodibenzofurano

OCDF: octaclorodibenzofurano.

068: *Pleurotus* sp CCB068

PT: *Pleurotus tailândia*

94/03: *Pleurotus* sp PSC 94/03

PSC: *Pleurotus sajor caju*

20MA: *Pleurotus sajor caju* 020

BPC: *Phanerochaete chrysosporium*

BAC: *Agaricus campestris*

2,7-DCDD: 2,7-diclorodibenzo-*p*-dioxina

RESUMO

As dibenzo-*p*-dioxinas e dibenzofuranos policlorados (PCDD/Fs) são compostos formados como subprodutos, não intencionais, em processos industriais e em processos de combustão, sendo a incineração de resíduos, a mais importante fonte destes compostos. Os isômeros com o cloro substituído nas posições 2,3,7,8 apresentam grande risco para a saúde humana devido a sua toxicidade, potencial carcinogênico, efeito potencial nos sistemas reprodutivos e imunológicos em animais e disrupção endócrina. Os PCDD/Fs são quimicamente estáveis, apresentam baixa solubilidade em água e se acumulam na cadeia alimentar. O risco à saúde pública por exposição às dioxinas e furanos em locais contaminados pode ser significativo. Como resultado, a limpeza de ambientes contaminados por dioxinas é uma área que requer mais atenção. Técnicas microbiológicas são ferramentas úteis para a descontaminação de áreas contaminadas com materiais tóxicos pois não somente economizam energia como também reduzem a necessidade de adição de produtos químicos.

Neste trabalho foram avaliadas 21 linhagens de fungos basidiomicetos e pré-selecionadas 7 capazes de crescer em meio contendo cinzas de incinerador, contaminadas com dioxinas e furanos policlorados (62 ng I- TEQ/ kg). *Pleurotus* sp CCB068 se destacou entre as 7 linhagens pré-selecionadas devido à alta produção das enzimas ligninolíticas MnP (± 19 U/L) e lacase (± 17 U/L), produção de biossurfactantes, além de promover a redução da toxicidade do meio de cultivo contendo cinzas durante o período avaliado e, portanto, foi selecionado para ser utilizado em experimentos de degradação utilizando o dibenzofurano e PCDD/Fs.

Quando cultivado em meio contendo diferentes concentrações de cinzas (50g/L; 70g/L; 90g/L; 130g/L; 170g/L, 210g/L e 250g/L); foi verificado que a concentração de 70 g/L favoreceu uma maior produção de enzimas MnP e lacase por *Pleurotus* sp. CCB068 com conseqüente redução da toxicidade do meio. Concentrações de cinzas superiores a 70g/L não favoreceram a produção das enzimas e também não atuaram na redução da toxicidade do meio para este fungo.

Pleurotus sp. CCB068 degradou até 74% dos compostos após 21 dias de cultivo. Os resultados obtidos em experimentos de degradação de PCDD/Fs indicaram o grande potencial deste fungo para ser aplicado em processos de biorremediação, pois o mesmo foi hábil para degradar os 14 compostos dentre os 17 isômeros de PCDD/Fs avaliados após 64 dias de cultivo em meio contendo 70 g/L de cinzas. Determinações de metais pesados sugeriram também que *Pleurotus* sp CCB068 removeu 100% de cádmio, 47 % de cromo total e 15,2 % de chumbo das cinzas após 64 dias de cultivo.

ABSTRACT

Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans (PCDD/Fs) are compounds produced as by-products, unintentionally, in industrial processes and combustion processes. Municipal solid waste incineration is one major source of these compounds. The isomers with chlorines substituted in the 2,3,7,8 positions are thought to cause risks to human health due to their toxicity, carcinogenic potency, potential effects on animal reproductive and immunological systems and endocrine disrupting. PCDD/Fs are chemically stable, have low solubility in water, and have been shown to accumulate in the food chain. Public health risk from environmental exposure to dioxins from contaminated sites can be significant. As a result, the clean up of environmental dioxin contamination deserves more attention. Microbiological techniques are useful tools for the decontamination of toxic materials, which not only save energy but also reduce the need for additional chemicals.

In this work twenty one basidiomycete fungal strains were evaluated and seven were pre-selected for their ability to grow in medium containing municipal wastes fly ashes contaminated with PCDD/Fs (62 ng I- TEQ/kg). All the seven strains produced ligninolytic enzymes and biosurfactants. *Pleurotus* sp CCB068 was selected among these seven strains due to high levels of the ligninolytic enzymes MnP (± 19 U/L) and laccase (± 17 U/L) activities and of biosurfactants produced, as well as the reduction on the toxicity following its growth on the fly ashes containing medium. *Pleurotus* sp CCB068 was then used in experiments for the determination of its capacity to degrade dibenzofuran and PCDD/Fs.

When grown on medium containing varied concentrations of fly ashes (50g/L; 70g/L; 90g/L; 130g/L; 170g/L, 210g/L and 250g/L), it was observed that 70 g/L medium favored the production of MnP and laccase by *Pleurotus* sp. CCB068 and reduction of the toxicity. Higher amounts of fly ashes inhibited both enzymes activities and toxicity reduction.

Pleurotus sp. CCB068 degraded up to 74% of the tested compounds following its growth for 21 days, and was able to degrade 14 among the 17 PCDD/Fs isomers used.

These results indicate that this strain has great potential for application in bioremediation of contaminated sites. Furthermore, heavy metals determination showed that *Pleurotus* sp CCB068 removed 100% of cadmium, 47 % of chromium, and 15.7 % of the lead present in the fly ashes used.

1 INTRODUÇÃO

A revolução industrial trouxe grandes avanços tecnológicos e científicos para a humanidade, mudando totalmente a face do planeta. Porém, a rápida industrialização e o consumo de diversos produtos ocasionou sérios danos ao meio ambiente. Atualmente, as maiores heranças deixadas por essa época, são a poluição de todas as matrizes ambientais (ar, água, solos, sedimentos), o grande volume de resíduos e o acúmulo de uma variedade de compostos tóxicos, sintetizados pelo homem, no ambiente. Dentre os inúmeros compostos considerados altamente tóxicos, que estão amplamente distribuídos nas diversas matrizes ambientais, encontram-se as dioxinas e os furanos policlorados (PCDD/Fs). As dioxinas não são produzidas comercialmente e não possuem aplicações industriais, somente são sintetizadas em pequenas quantidades, como compostos padrões, para fins de pesquisas. Há 25 anos, pesquisas científicas têm demonstrado que os PCDD/Fs podem ser gerados durante amplo limite de atividades, incluindo a produção de pesticidas clorados, corantes e pigmentos, refinamento de petróleo, branqueamento de polpa celulósica, processos metalúrgicos e em processos de combustão, sendo a incineração de resíduos (municipais, industriais e hospitalares) (ASSUNÇÃO e PESQUERO, 1999) a mais importante fonte destes compostos. As dioxinas são encontradas com frequência nas proximidades de incineradores antigos, onde não há tecnologia adequada e filtros capazes de reter esses compostos. As cinzas provenientes da incineração de lixo urbano têm atraído muita atenção em todo o mundo por elas serem geradas em grandes quantidades e pelo fato das mesmas serem ricas em metais pesados e em PCDD/Fs, além de outros compostos tóxicos como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) e bifenilos policlorados (PCBs) os quais apresentam alta toxicidade, ocasionando impacto negativo para o ambiente (HESTER e HARRISON, 1994). A disposição das cinzas contendo esses compostos altamente tóxicos pode levar a problemas ambientais significativos, tais como contaminação do subsolo e lençol freático em aterros. Portanto, é necessário remover esses contaminantes tóxicos da cinza antes de sua disposição final (HUANG; TAKAOKA e TAKEDA, 2003).

Muitos tratamentos físico-químicos têm sido bem estudados e desenvolvidos para o tratamento dos PCDD/Fs presentes nas cinzas. Entretanto, a utilização dessas técnicas apresenta alguns aspectos negativos, como por exemplo, a possibilidade de regeneração dos PCDD/Fs e alto custo do tratamento (HUANG; TAKAOKA e TAKEDA, 2003). Portanto, é necessário o desenvolvimento de um método efetivo para remoção desses compostos presentes na cinza, que

tenha baixo custo e alta eficiência. Uma das possibilidades para minimizar os custos e eliminar, completamente, os compostos é a utilização de biorremediação. Assim sendo, a seleção de microrganismos competentes para degradar PCDD/Fs representa um desafio para os microbiologistas ambientais e demais profissionais que atuam nessa área, além de ser o primeiro passo para o desenvolvimento e implementação da tecnologia de biorremediação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os PCDD/Fs são considerados compostos xenobióticos (produzidos pelo homem) e recalcitrantes (não biodegradáveis), estando em primeiro lugar na lista dos resíduos com maior potencial de toxicidade do mundo, além de fazerem parte do grupo dos 12 POPs (Poluentes orgânicos persistentes). POPs são substâncias químicas extremamente tóxicas produzidas em diversas atividades industriais. São chamados de persistentes porque não são degradados facilmente na natureza e são lipofílicos (SAKAI; URANO e TAKATSUKI, 2000). Em contato com os tecidos gordurosos dos seres vivos, se acumulam, sendo transferidos a todos os níveis tróficos da cadeia alimentar. Os POPs estão entre os principais problemas ambientais e de saúde pública deste novo século (RICE, 2003). Os prejuízos à saúde e ao meio ambiente são enormes. Por isso muitos países estão estudando a implantação de tecnologias que visem à minimização ou erradicação destes compostos. Em maio de 2001, foi assinado em Estocolmo, Suécia, um Tratado Internacional da Organização das Nações Unidas, que teve como objetivo a erradicação de 12 compostos conhecidos como POPs (dioxinas e furanos policlorados – PCDD/Fs; PCBs; DDT; Aldrin; Eldrin; Dieldrin; Heptacloro, Clordano; Hexaclorobenzeno-HCB; Mirex e Toxafeno) do meio ambiente (BREIVIK et al, 2004). Cento e trinta e um países, incluindo o Brasil, se comprometeram a suspender completamente o uso e trabalhar para eliminar as fontes dessas substâncias (RICE, 2003).

As dibenzo-*p*-dioxinas policloradas (PCDDs) e os dibenzofuranos policlorados (PCDFs), comumente chamados de dioxinas e furanos, são duas classes de compostos tricíclicos, de função éter, com estrutura quase planar e que possuem propriedades físicas, biológicas e tóxicas semelhantes (ASSUNÇÃO e PESQUERO, 1999).

Os átomos de cloro se ligam aos anéis benzênicos, possibilitando a formação de 75 compostos da classe das dioxinas e 135 da classe de furanos, totalizando 210 compostos. As fórmulas estruturais genéricas são mostradas na Figura 2.1.

Segundo FRIES (1995), três características físico-químicas são importantes para a determinação do destino e transporte dos PCDD/Fs no ambiente: baixa solubilidade em água (variando de 317 ng/L para tetraclobenzo-*p*-dioxina, TCDD, a 0,74 ng/L para a octaclorodibenzo-*p*-dioxina, OCDD); alta solubilidade em compostos orgânicos (coeficiente de partição octanol-água, log K_{ow} , variando em torno de 6,8 para TCDD e 8,2 para OCDD e octaclorodibenzofurano, OCDF) e volatilidade. Os PCDD/Fs são caracterizados como

semivoláteis a não voláteis, com pressão de vapor variando entre 10^{-8} atm para TCDD a 10^{-12} atm para o OCDD. PCDD/Fs que apresentam átomos de cloro ligado nas posições 2,3,7 e 8 são química e metabolicamente estáveis sob condições normais, sendo assim são encontrados em todas as matrizes ambientais. Como resultado, os PCDD/Fs persistem e concentram-se nos lipídeos dos sistemas biológicos, incluindo alimentos produzidos de animais.

Das 210 dioxinas e furanos existentes, 17 compostos com substituições nas posições 2, 3, 7 e 8 destacam-se sob o ponto de vista toxicológico. A toxicidade aguda mais alta é atribuída a 2,3,7,8- TCDD ($1\mu\text{g/kg}$) (ASSUNÇÃO e PESQUERO, 1999). A toxicidade de 2,3,7,8-TCDD é muito variável em diferentes animais.

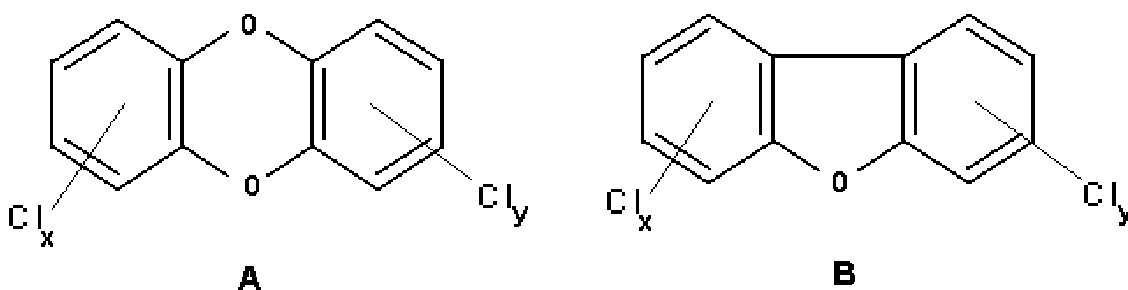


Figura 2.1. Estrutura química do dibenzo-*p*-dioxinas, PCDD, (A) e dibenzofuranos policlorados, PCDF, (B) (ASSUNÇÃO E PESQUERO, 1999)

Vários estudos epidemiológicos mostraram que pessoas expostas a misturas de PCDD/Fs e outros produtos químicos apresentam aumento da incidência de câncer em diferentes locais do organismo, além de produzir efeitos nos sistemas reprodutivos, deficiência imunológica, disfunção endócrina incluindo diabetes Mellitus, alteração nos níveis hormonais, danos neurológicos, incluindo alterações cognitivas e comportamentais em recém-nascidos de mães expostas à dioxina, danos ao fígado, elevação de lipídeos no sangue, o que constitui em fator de risco para doenças cardiovasculares, e danos à pele (ASSUNÇÃO e PESQUERO, 1999).

As PCDD/Fs e os PCBs encontram-se presentes nas matrizes ambientais como misturas complexas. Possuem diferentes concentrações dependendo da fonte de origem, solubilidade, volatilidade e estabilidade metabólica dos seus congêneres. Esta complexidade aliada às diferenças no efeito tóxico produzido pelos diferentes congêneres aumenta a dificuldade em se avaliar o risco para os seres humanos e animais. Para facilitar a avaliação de risco, a Comunidade

Internacional representada por órgãos governamentais como EPA (Environmental Protection Agency) e WHO (World Health Organization) desenvolveram o conceito de fatores de equivalência tóxica (TEFs) para normalizar os valores encontrados dos congêneres com baixa toxicidade, e que são mais abundantes, em relação ao congênere mais tóxico desta classe, o 2,3,7,8 –TCDD, que é encontrado em quantidades muito baixas. Os TEFs comparam o potencial de toxicidade individual de cada dioxina com a toxicidade relativa do 2,3,7,8,-TCDD. Os TEFs têm sido designados para 7 PCDDs, 10 PCDFs e 12 PCBs. Os valores de TEFs são tabelados para os congêneres e variam de 0,0001 a 1 (TEF do 2,3,7,8-TCDD) e são determinados experimentalmente. O 2,3,4,7-TCDD tem um TEF de 1,0 e todos os outros congêneres têm valores de TEF menores, entre 0,5 a 0,00001 (HARRISON e EDULJEE, 1999).

Quando os valores dos TEFs são multiplicados pelos respectivos valores das concentrações determinadas para cada congênere é possível se calcular o Equivalente Tóxico Internacional (I-TEQ). As concentrações ambientais, os limites de emissões e de outros padrões são universalmente expressos em unidades de I-TEQ (HARRISON e EDULJEE, 1999).

As dioxinas e os furanos não ocorrem naturalmente no ambiente e não possuem aplicações industriais. Elas são formadas como subprodutos não intencionais durante vários processos envolvendo o cloro ou compostos que o contenham, como a produção de diversos produtos químicos, especialmente na síntese de pesticidas, no branqueamento na pasta celulósica, e nos processos de combustão, sendo a incineração de resíduos (municipais, industriais e hospitalares), a mais importante fonte destes compostos (ASSUNÇÃO e PESQUERO, 1999). O co-processamento, utilizando resíduos contendo cloro em sua constituição, também pode ocasionar grandes problemas de contaminação ambiental, como é o caso dos caieiros, onde se utilizam pneus e outros resíduos plásticos contendo cloro para queima de rochas calcárias e produção da cal (VAN OVERMEIRE et al., 2000)

Existem 3 modelos propostos para explicar a formação de PCDD/Fs durante a incineração: alta temperatura de pirossíntese, formação *de novo* em baixa temperatura do carbono macromolecular e do cloro orgânico e inorgânico presente na cinza e a formação de precursores orgânicos no qual a cinza tem um importante papel como catalisador. Embora todos esses mecanismos tenham sido conhecidos durante muitos anos poucos mecanismos de reação detalhados podem ser oferecidos, devido à extrema complexidade da cinza (TAKASUGA et al., 2000). As emissões de PCDD/Fs resultam em subsequente deposição na superfície do solo e da

vegetação. Deste modo, essas matrizes podem ser usadas também como monitores ambientais de PCDD/Fs (DOMINGO; GRANERO e SCHUHMSCHER, 2001). Aproximadamente 0,1% do carbono que entra no incinerador origina micropoluentes orgânicos, tais como clorobenzenos, clorofenóis, bifenilos policlorados (PCBs), dibenzo-*p*-dioxinas e dibenzofuranos policlorados (PCDD/Fs), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) entre outros (HESTER e HARRISON, 1994). Estes micropoluentes são gerados como resultado da combustão incompleta no processo de combustão e pós-combustão (HUANG; TAKAOKA e TAKEDA, 2003).

Desde 1977, quando os PCDD/Fs foram detectados pela primeira vez nos incineradores municipais, as emissões desses poluentes ambientais têm sido uma questão polêmica relacionada aos processos de incineração (SCHUHMACHER et al., 2000). Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de quantificar os PCDD/Fs formados nos processos de incineração em todo o mundo, através de análises dos gases liberados, das cinzas e também do solo e da vegetação localizados nas proximidades de incineradores municipais antigos. Em 1996, amostras de ar foram coletadas no pátio do Estádio Municipal de Beisebol, na cidade de São Paulo, a uma distância de aproximadamente 500 m da chaminé do incinerador municipal. Essas amostras foram analisadas e detectou-se 13017 fg/m^3 (isto é, cerca de 13 pg/m^3) expresso em termos de PCDDs (dioxinas policloradas) mais PCDF (dibenzofuranos policlorados) em condições favoráveis à dispersão dos poluentes (OLIVEIRA, 1996).

SCHUHMACHER et al. (2000) determinaram os níveis de PCDD/F em amostras coletadas de vegetação e solo de 24 locais nas proximidades de um velho incinerador municipal (San Adrià del Besòs, Barcelona, Espanha). Os resultados obtidos mostraram que os níveis de PCDD/Fs no solo variaram de 1,22 a 34,8 ng I-TEQ/kg. Os níveis de PCDD/Fs em amostras de vegetação variaram entre 0,33 e 1,98 ng I-TEQ/kg. Embora as concentrações de PCDD/Fs encontradas no solo possam ter sido maiores do que aquelas recentemente encontradas em solos próximos de incineradores da Catalunha, os níveis detectados foram semelhantes aos níveis destes poluentes encontrados em incineradores de outros países.

O ciclo da dioxina através do ambiente envolve múltiplas fontes de contaminação, diferentes fluxos e muitos reservatórios. As dioxinas originadas da combustão de rejeitos, combustíveis e dos diversos processos industriais, emitidas no ar, depositam-se no solo e se combinam com a matéria orgânica. Nos aterros, a dioxina pode permanecer isolada, sendo armazenada por longos períodos, ou pode sofrer lixiviação devido à influência de compostos

oleosos presentes no local, que servirão como carreadores desses compostos no solo. As fontes de dioxina na água originam-se do arraste pelas chuvas de produtos contaminados, da deposição do ar e das descargas de efluentes de alguns processos industriais. Uma vez no ambiente, as dioxinas, serão depositadas nas superfícies das plantas que servirão de alimentos para inúmeros animais, ocasionando o transporte desses compostos nos diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar.

2.1 BIODERGRAÇÃO DE PCDD/Fs

O tratamento de compostos orgânicos por métodos microbiológicos e biocatalíticos, com a utilização dos fungos bem como das bactérias, tem um importante papel no ciclo global do carbono. Este potencial biológico foi e está sendo explorado em compostagem e outros processos de degradação. Processos biotecnológicos têm sido desenvolvidos para a remediação do diesel e derramamento de óleos e tecnologias de biorremediação, para solventes halogenados e outros produtos químicos industriais de preocupação ambiental. A implementação de tais processos de biorremediação para a remoção de tóxicos como dibenzofuranos policlorados e compostos críticos relacionados, representa um desafio para os microbiologistas e engenheiros ambientais (WITTICH, 1998).

A biorremediação, ou seja, o uso de microrganismos na degradação de tais poluentes ambientais e no tratamento de rejeitos agroindustriais está emergindo como uma tecnologia alternativa para a remoção de poluentes ambientais. Recentes regulamentos adotados pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos permitiram que a biorremediação fosse considerada como uma alternativa durante o desenvolvimento de planos de ações corretivas. A biorremediação é também considerada uma tecnologia que apresenta custo eficiente quando comparada às tecnologias de limpeza tradicionais, pois possibilita uma economia de 65 a 85 % (ZECHENDORF, 1999).

As técnicas microbiológicas são ferramentas úteis para a descontaminação de materiais tóxicos, sendo que não somente economizam energia como também reduzem a necessidade de produtos químicos adicionais (KÖLLER; MÖDER e CZIHAL, 2000). Os microrganismos possuem uma habilidade única para interagir química e fisicamente com ampla variedade de compostos, tanto produzidos pelo homem (fonte antropogênica) como também compostos encontrados naturalmente, promovendo mudança estrutural ou completa degradação da molécula alvo (CO₂ e H₂O) (HEAD, 1998).

Dependendo das condições do local, a biorremediação pode ser realizada *in situ* (no local) ou *ex situ* (material contaminado retirado e tratado em outro local). Segundo artigos citados por WITTICHI (1998), as primeiras investigações sobre biodegradação utilizando bactérias que degradavam aerobicamente as dioxinas e furanos tiveram início na década de 70 por KEARNY; WOOLSON e ELLINGTON (1972), MATSUMURA e BENEZET (1973), WARD e MATSUMURA (1978), que investigaram a biodegradação da 2,3,7,8-TCDD, vários anos antes do famoso acidente em Seveso, na Itália em 1976. Estudos realizados por PHILLIPPI et al. (1981), e por QUENSEN e MATSUMURA (1983), sobre a biodegradação de 2,3,7,8-TCDD em sistemas de laboratório dão a evidência clara da transformação bacteriológica deste composto na presença de cepas isoladas das áreas poluídas em Seveso.

CERNIGLIA, MORGAN e GIBSON (1979), e KLECKA e GIBSON (1980) usaram cepas de *Pseudomonas* sp. e *Sphingomonas* sp. degradadoras de naftaleno e bifenilo, para a transformação de dibenzo-*p*-dioxinas, dibenzofuranos e vários derivados monoclorados. A degradação de todos os compostos foi incompleta e aumentou a toxicidade dos produtos finais.

A cepa *Alcaligenes* sp. JB1 mineralizadora de bifenilo degradou algumas dibenzo-*p*-dioxinas e dibenzofuranos mono- e diclorados em culturas de bateladas e cultura contínua. Durante a degradação, os derivativos mono e dihidroxilados dos compostos alvos acumularam. (PARSONS e STORMS, 1989; PARSONS; RATSACK e SIEKERMAN, 1990).

WITTICH et al. (1992) fizeram uma seleção de bactérias utilizadoras de dibenzo-*p*-dioxinas e uma cepa de *Sphingomonas* isolada de culturas enriquecidas inoculadas com amostras de água do rio Elbe. O isolado cresceu com dibenzo-*p*-dioxinas e também com dibenzofuranos como única fonte de carbono e energia, utilizando tempos de crescimento de 5 e 8 h, respectivamente. Os resultados das determinações das atividades enzimáticas e consumo de oxigênio sugerem uma *meta* clivagem dos compostos trihidroxi(2,2',3-trihidroxidifenil éter ou 2,2',3,-trihidroxidifenil) que foram os produtos iniciais formados.

RESNICK e GIBSON (1996) estudaram a degradação dos dibenzofuranos por *Pseudomonas* sp. Os resultados obtidos mostraram que a degradação deste composto aromático foi de 60% a 70% de *cis*-1,2-dihidrodiol e 30% a 40% de *cis*-2,3-dihidridiol como produtos da dioxigenação inicial dos dibenzofuranos.

SCHREINER et al. (1997) reportaram que a cepa HH69 reduziu em 31% do 2,3,7,8-TCDF e 15% de 2,3,7,8-TCDD em 84 dias, enquanto a cepa *Pseudomonas* sp PS12

mineralizadora de tetraclorobenzeno (SANDER et al., 1991) reduziu em 64% de 2,3,7,8-TCDD do caldo de cultura, no mesmo período, e 100% do 2,3,7,8-TCDD em 25 dias .

Fungos basidiomicetos envolvidos na degradação branca da madeira são conhecidos por terem um importante papel na mineralização da macromolécula da lignina à dióxido de carbono e água no ambiente terrestre, enquanto as bactérias são relativamente menos importantes neste processo (RAGHUKUMAR et al., 1999). Sendo a lignina uma macromolécula complexa, sua biodegradação requer interações entre enzimas e alguns agentes não enzimáticos de baixa massa molar, produzidos extracelularmente, para que ocorra uma completa mineralização até CO₂ e H₂O (BONO et al., 1990).

A capacidade dos fungos basidiomicetos de degradar compostos xenobióticos deve-se a semelhança estrutural da lignina com alguns compostos orgânicos sintéticos, principalmente os aromáticos. Estudos de biodegradação utilizando diversos compostos xenobióticos, tais como dioxinas, furanos, HAPs e PCBs utilizando diversos fungos de decomposição branca como *Phanerochaete chrysosporium* (BUMPUS, 1985), *Phanerochaete sordida* (TAKADA et al, 1996), *Pleurotus ostreatus* (EGGEN e MAJCHERCZYK, 1998), *Trametes versicolor* (KUBÁTOVÁ et al, 2001), *Pleurotus* sp. *Florida* e *Dichomitus squalens* (ROSENBROCK et al; 1997), mostraram a habilidade desses microrganismos para degradar uma variedade desses compostos e evidenciaram o potencial dos mesmos para aplicação em processos de biorremediação em solos e água.

2.1.1 Enzimas Ligninolíticas produzidas por microrganismos

A complexidade estrutural da lignina requer a presença de um sistema altamente diversificado de enzimas ligninolíticas, enzimas produtoras de H₂O₂ e enzimas de natureza redutora. O papel de cada enzima, atuando individualmente é irrelevante no processo global de degradação de lignina, portanto a biodegradação deriva de uma combinação de processo de óxido-redução (SCHOEMAKER, 1990).

Devido à natureza e presença de diferentes tipos de ligações existentes entre os monômeros da lignina, como por exemplo β - 1, β - β , β - O - 4 e 4 - O -5 (Figura 2.2), as enzimas responsáveis pelo ataque inicial precisam ser não-específicas. A ligação éter, característica estrutural comum aos compostos biológicos (lignina) e xenobióticos, está relacionada ao alto grau de resistência para mineralização biológica desses (BUNZ e SCHMIDT, 1997).

Os fungos de degradação branca possuem um poderoso sistema enzimático extracelular e não específico composto por enzimas como a lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase, enzimas produtoras de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e de enzimas ligadas à membrana como as enzimas da família do citocromo P-450 que catalisam a degradação de um número surpreendente de compostos (CLEMENTE et al., 2001).

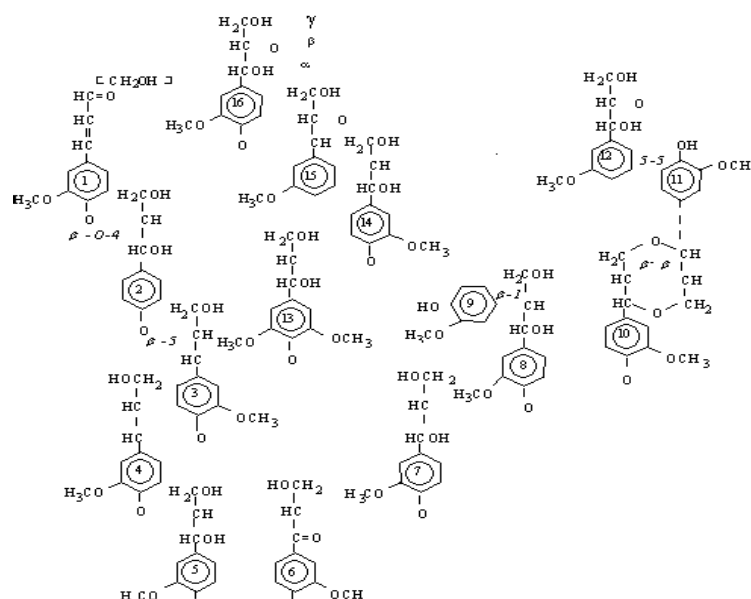


Figura 2.2 Estrutura modelo de lignina proposta por E. Adler (FENGEL e WEGENER, 1989).

As diferenças estruturais e químicas no substrato heterogêneo de lignina conduzem a uma especialização na produção das enzimas ligninolíticas dos microrganismos capazes de degradá-las, que são classificados assim em cinco grupos (TUOR, WINTERHALTER e FIECHTER, 1995):

➤ Fungos de decomposição branca que expressam LiP, MnP e lacase. Este grupo contém os mais conhecidos fungos de decomposição branca *Coriolus versicolor*, *P. chrysosporium* e *Phlebia radiata*. O *P. chrysosporium* está neste grupo desde que a produção de lacase foi reportada (ANDER; HATAKKA e ERIKSSON, 1980; ERIKSSON; JOHNSRUD e VALLANDER., 1983). Entretanto este fungo não é considerado produtor de lacase. Todos eles colonizam madeiras decíduas, e *P. radiata* e *Phanerochaete chrysosporium* degradam coníferas.

- Fungos de decomposição branca que produzem MnP e lacase, não secretam níveis detectáveis de LiP. São potentes degradadores de lignina. *Dichomitus squalens* e o fungo comestível *Lentinula edodes* pertencem a este grupo.
- Fungos de decomposição branca que apresentam produção de LiP e outra fenol-oxidase. Lacase é a fenol-oxidase mais produzida, mas no caso do *Coriolus pruinosum* foi detectada a produção de MnP. Estes fungos crescem em qualquer madeira. Excetuando-se *Phlebia tremellosus* que também degrada coníferas.
- Quatro fungos de decomposição branca (*Bjerkandera adusta*, *Daedaleopsis confragosa*, *Phallus impudicus* e *Polyporus varius*), secretam somente LiP. Eles são degradadores de madeiras duras.
- O último grupo consiste de fungos que não estão completamente caracterizados. *Fomes lignosus* e *Trametes cingulata* são de degradação branca, mas não foram detectadas quaisquer das enzimas em seus meios de cultura.

Os fungos podem também expressar diferentes enzimas quando submetidos a culturas agitadas e estacionárias (TUOR; WINTER e FIECHTER, 1995).

2.1.1.1.Lignina-peroxidase (LiP; EC 1.11.1.7)

A LiP, isolada em 1983 por TIEN e KIRK e GLENN et al., é uma glicoproteína, contendo 20-30% de açúcar, ferro como grupo prostético e requer peróxido de hidrogênio para sua atividade catalítica (HATAKA,1994). Apresenta massa molar de, aproximadamente, 38-43 kDa, apresentando ponto isoelétrico entre 3,2 - 4,0 e pH ótimo de atividade próximo a 3,0. Diversas isoenzimas já foram isoladas do fungo de decomposição branca *Phanerochaete chrysosporium*, sendo que sua produção é regulada geneticamente em condições limitantes de nitrogênio e carbono. A LiP é produzida durante o metabolismo secundário, em resposta à falta desses nutrientes. Na presença desses nutrientes ocorre completa repressão de sua síntese.

A LiP catalisa a oxidação de uma grande variedade de compostos modelos de lignina e poluentes aromáticos, na presença de H₂O₂ (BUSWELL e ODIER, 1987; HIGUCHI, 1990). Essas reações incluem oxidação do álcool benzílico, quebra das cadeias laterais, reações de abertura de anéis aromáticos, desmetilações e desclorações oxidativas. Todas essas reações são compatíveis com o mecanismo envolvido na degradação não específico desta enzima (RENGANATHAN e GOLD, 1986).

O mecanismo de atuação da LiP (Figura 2.3) se dá através de oxidação pela abstração de

um elétron da molécula de lignina e compostos semelhantes, resultando na formação de radicais catiônicos arila. Posteriormente, através de uma série de reações não enzimáticas os radicais dão origem a uma variedade de produtos finais (HIGUCHI, 1990).

O álcool veratrílico, um metabólito produzido por diversos fungos de decomposição branca sob condições ligninolíticas, desempenha um papel importante no ciclo catalítico desta enzima. Ele atua como um agente redutor da enzima e aparentemente a protege da inativação por excesso de H_2O_2 (WARIISHI e GOLD, 1990; FIELD et al., 1993).

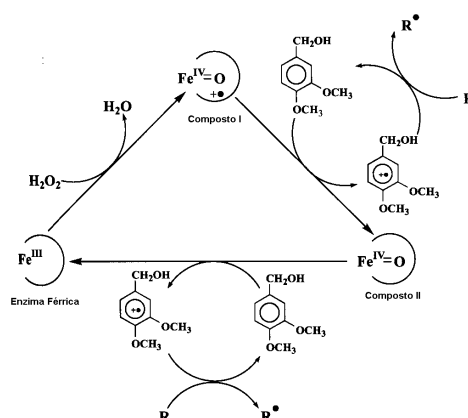


Figura 2.3 Ciclo catalítico da lignina peroxidase (CAMERON; TIMOFEEVSKI e AUSTM, 2000).

Existe um crescente estudo desta enzima e também dos fungos que a produzem, devido ao seu potencial de aplicação industrial em processos de descontaminação de ambientes (ERIKSSON, 1990). As enzimas oxidativas possuem um importante papel na descontaminação de efluentes e solo (CAMERON; TIMOFEEVSKI e AUSTM, 2000).

2.1.1.2 Manganês-peroxidase (MnP; EC 1.11.1.7)

A peroxidase extracelular mais comumente encontrada, produzida por fungos de degradação branca, é a manganês peroxidase. Esta enzima foi isolada de culturas de *P. chrysosporium* por KUWAHARA et al. em 1984. É uma glicoproteína com ferro como grupo prostético, depende de H_2O_2 para sua atividade, seu ponto isoelétrico é de aproximadamente 4,2-4,9 e massa molar entre 45-47 KDa, sendo o ciclo catalítico semelhante ao da LiP (GLENN e GOLD, 1985). A MnP é produzida simultaneamente com a LiP, durante o metabolismo secundário e é regulada pelas concentrações de nitrogênio e carbono no meio de cultura

(BUSWELL e ODIER, 1987). As MnPs participam de reações de despolimerização de ligninas e cloroligninas, desmetilação de lignina e deslignificação (LACKNER; SREBOTNIK e MESSNER, 1991; PEREZ e JEFFRIES, 1992; PAICE et al., 1993).

A oxidação de lignina e outros compostos fenólicos por MnP é dependente de íons manganês II (GLENN e GOLD, 1985; GOLD et al., 1989; HOFRICHTER et al., 1999). Como é mostrado na Figura 2.4, a redução primária do substrato no ciclo catalítico de MnP é Mn(II), que reduz eficientemente os compostos I e II, gerando Mn(III), que oxida o substrato orgânico

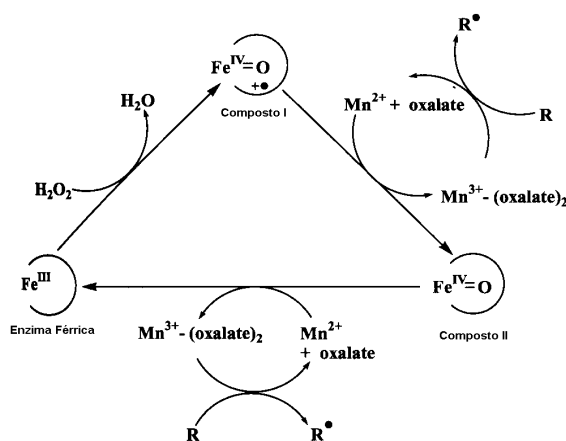


Figura 2.4. Ciclo catalítico da manganês peroxidase (CAMERON; TIMOFEEVSKI e AUSTM, 2000).

A MnP é conhecida por oxidar vários fenóis, componentes de lignina fenólica e clorofenóis. Recentemente, também foi demonstrada a oxidação de componentes de lignina não-fenólica e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos na presença de co-oxidantes (lipídeos insaturados) ou organossolventes (acetona) por esta enzima. Considerada como um biocatalisador potencial na biotecnologia ambiental, é produzida por diferentes fungos de decomposição branca e tem sido utilizada, na remediação de solos contaminados, descoloração de efluentes, despolpação e processos de branqueamento (LACKNER; SREBOTNIK e MESSNER, 1991)

2.1.1.3 Lacases (Benzenediol: oxigênio oxidoreductase, EC 1.10.3.2)

A lacase é uma polifenoloxidase, descoberta em exudados de *Rhus vernicifera*, árvore japonesa (YOSHIDA, 1883); subsequentemente descobriu-se também que ela estava presente em fungos (BERTRAND, 1896; LABORDE, 1896). É uma glicoproteína, que contém cobre em seu

sítio ativo, não requer H_2O_2 , e catalisa a redução de O_2 para H_2O (Fig. 2.5) As formas constitutiva e induzida são conhecidas, sendo que a forma induzida geralmente apresenta maior atividade (LEONOWICZ ; SZKLARZ e WOJTAS-WASILEWA, 1985).

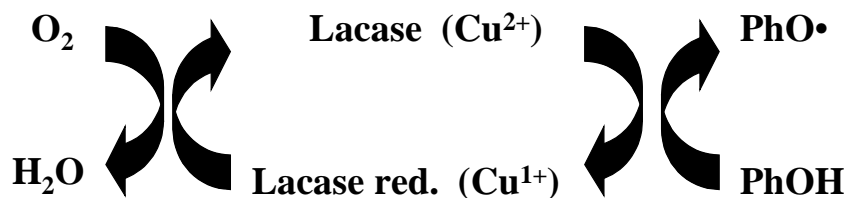


Figura 2.5. Representação de uma reação catalisada por lacase. PhOH representa um substrato fenólico.

Em geral, a lacase apresenta 4 átomos de cobre, os quais são distribuídos em diferentes sítios de ligação e são classificados em três tipos: cobre tipo 1, 2 e 3, que são diferenciados por propriedades específicas, tendo um importante papel no mecanismo catalítico da enzima (MCGUIRL e DOOLEY, 1999). De acordo com CALL e MÜCKE (1997), o cobre 1 e 2 estão envolvidos na captura e transferência do elétron. O cobre tipo 2 e 3 estão envolvidos na ligação com o oxigênio. Compostos fenólicos são amplamente distribuídos na natureza, e sua oxidação é importante em processos como, oxidação celular, proteção da parede celular, corpo de frutificação, processamento de sucos e vinhos, delignificação de polpa, descontaminação de solos e água poluídos (XU, 1996; SMITH; THURSTON e WOOD, 1997).

A lacase catalisa a oxidação via transferência de um elétron de fenóis para radicais fenoxila. A especificidade da enzima ao substrato oxidado depende da origem da lacase. Assim lacases de diferentes fungos podem oxidar diferentes substratos, inclusive em diferentes pHs. Algumas lacases apresentam pH ótimo em faixas ácidas (2,5-3,5), enquanto outras apresentam atividade ótima em pH neutro (6-7) (RINGLING e VAN ALFEN, 1993). A função fisiológica desta enzima não é clara e seu papel na biodegradação da lignina é incerto (GOLD e ALIC, 1993). Assim, propôs-se que a lacase tem um papel na redução da toxicidade dos compostos fenólicos por reações de polimerização (BOLLAG; SHUTTLEWOTH e ANDERSON, 1988).

As lacases são muito difundidas na natureza, sendo produzidas por fungos ou plantas, podendo oxidar, desmetilar, polimerizar ou despolimerizar compostos fenólicos. Em plantas, têm sido associadas com lignificação. Em fungos, por outro lado, estão associadas à degradação de lignina. Seu potencial ligninolítico tem sido utilizado em processos de branqueamento e

polpação, aperfeiçoando a digestão de substratos lignocelulósicos e removendo os componentes fenólicos de efluentes, sucos de frutas (uva) e vinhos (ARORA e GILL, 2001). Atualmente, essa enzima também tem sido utilizada como biosensor para determinação da presença de contaminantes em amostras ambientais (DÚRAN e ESPOSITO, 2000).

Segundo GIANFREDA e RAO (2004), existe um interesse crescente no uso de fungos como agentes biorremediadores. A maioria dos fungos são organismos resistentes e podem tolerar maiores concentrações de poluentes do que as bactérias. Em particular, fungos de decomposição branca parecem ser organismos atraentes para aplicação em processos de biorremediação de locais poluídos por várias razões:

- ❖ São organismos onipresentes em ambientes naturais.
- ❖ São os únicos entre os microrganismos eucarióticos e procarióticos que possuem um poderoso sistema extracelular inespecífico com habilidade de oxidar vários poluentes ambientais, incluindo compostos de baixa solubilidade.
- ❖ Podem ser cultivados usando-se substratos baratos, tais como resíduos agrícolas, que podem ser facilmente acrescidos como nutrientes no local contaminado.
- ❖ Sendo fungos filamentosos, podem alcançar os poluentes no solo em caminhos que as bactérias não conseguiriam. Certamente eles crescem pela extensão das hifas e se estendem no solo com o crescimento.
- ❖ As enzimas ligninolíticas são principalmente de natureza constitutiva, não necessitando de prévia adaptação dos microrganismos aos poluentes, sendo possível ainda, a degradação dos poluentes em baixíssimas concentrações. Como demonstrado em *P. chrysosporium*, as enzimas são usualmente expressas sob condições deficientes de nutrientes que são encontradas predominantemente na maioria dos solos contaminados.

O primeiro estudo sobre degradação de 2,3,7,8-TCDD utilizando fungo de degradação branca *Phanerochaete chrysosporium* foi realizado por BUMPUS et al. (1985). A mineralização a dióxido de carbono do 2,3,7,8- TCDD foi menor que 2,5%.

BUMPUS (1989) estudou a degradação de numerosos HAPs utilizando uma mistura de óleo contendo antraceno, dibenzofurano (DF) e dibenzofurano metilado. Um modelo mecanístico da degradação de DD (dibenzo-*p*-dioxinas), utilizando $^{18}\text{H}_2\text{O}$ em reação da ligninase, demonstrou a clivagem da ligação éter como um próximo passo seguindo as hidroxilações laterais. Isto levou a formação de catecol e metabólitos altamente hidroxilados. Alguns desses compostos foram

utilizados como fonte de carbono pelo basidiomiceto sendo este depois oxidado a quinonas mais tóxicas ou sendo repolimerizados (JOSHI e GOLDI, 1994).

GOLD e ALIC (1993) propuseram uma via de degradação de 2,7- diclorodibenzo-*p*-dioxina e 2- diclorodibenzo-*p*-dioxina por *P. chrysosporium*, evidenciando o envolvimento das enzimas LiP, MnP e enzimas intracelulares na degradação destes compostos.

TAKADA et al. (1996) estudaram 2,3,7,8-TCDD/F e congêneres halogenados como compostos alvos das peroxidases produzidas pelo micélio de uma cepa de *Phanerochaete sordida*. Os resultados obtidos mostraram que as taxas de degradação foram significativas e houve formação de metabólitos. Concentrações iniciais em torno de 50 ng/ L foram degradadas de 10% a 60% em 7 dias. Nos meios contendo altas concentrações de 2,3,7,8-TCDD e OCDD, somente 10% foram degradados sob condições similares em 10 dias.

ROSENBROCK et al. (1997) estudaram o potencial para a mineralização aeróbica de dibenzo-*p*-dioxina (DD), em amostras de diferentes solos agrícolas contaminados com PCDD/Fs pelas atividades industriais. Todos os solos testados continham microflora indígena mineralizadora de dioxina (DD). O solo com o maior conteúdo de matéria orgânica (M.O.) e alto conteúdo de biomassa microbológica apresentou a melhor mineralização de DD, 36,6% em 70 dias, comparado com os 2 solos pobres em M.O., que apresentaram 19,5% e 23,3% de mineralização de DD. A melhor mineralização resultou do inóculo com fungos de decomposição branca (*Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus* sp., *Florida*, *Dichomitus squalens*) e um fungo lignolítico não identificado, o qual foi isolado de um solo contaminado com dibenzofurano policlorado. A mineralização acima de 50% em 70 dias foi reportada neste trabalho.

TAKADA et al. (1999) estudaram a degradação de dioxinas por *Phanerochaete sordida* YK-624. Neste estudo, a degradabilidade dos congêneres tetra- a octa- dos PCDD/Fs, extraídas das amostras de cinzas pelo fungo, foi examinada. Todos os isômeros de cada classe aparentemente foram degradados pelo fungo. A porcentagem de redução na quantidade total de PCDD e PCDF foi de 49% (tetraCDD) a 67% (HeptaCDD) e de 51% (TetraCDD) a 74 % (octaCDD), respectivamente.

2.2 BIOSSURFACTANTES E SUA APLICAÇÃO EM PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO

Uma das razões para a recalcitrância de muitos contaminantes orgânicos no solo, lençol freático, sedimentos é a sua hidrofobicidade, baixa solubilidade em água; portanto, baixa

biodisponibilidade. Surfactantes são moléculas anfipáticas (contendo grupo polar hidrofílico e um grupo apolar hidrofóbico) que desempenham importante papel em remediação, por terem a função de solubilizar e emulsificar hidrocarbonetos insolúveis ou outros compostos alvos, tornando-os disponíveis para os microrganismos.

Os biossurfactantes (surfactantes produzidos por microrganismos) são capazes de formar diversas estruturas tais como micelas, vesículas esféricas ou irregulares, estruturas lamelares entre outras (COLLA e COSTA, 2003). Eles acumulam-se nas interfaces apresentando diferentes polaridades, em especial água/óleo, ar/água e agem como agentes umectantes em superfícies sólidas (água/sólido). Esse processo dinâmico é baseado na habilidade dos biossurfactantes de reduzir a tensão superficial pelo remanejamento molecular, através do acúmulo na superfície de compostos insolúveis, influenciando as ligações de hidrogênio e outras interações hidrofóbicas - hidrofílicas, aumentando a área superficial destes, levando a um aumento da biodisponibilidade e conseqüentemente biodegradabilidade (COLLA e COSTA, 2003). Todos os biossurfactantes, sob diferentes condições e em diferentes sistemas, mostram habilidade para reduzir a tensão superficial e interfacial de misturas óleo/ água (COLLA e COSTA, 2003). Alguns microrganismos produzem biossurfactantes os quais auxiliam o acesso de compostos hidrofóbicos como fonte de carbono e energia (FRANCY et al., 1991). Muitos estudos têm demonstrado que a adição tanto de surfactantes sintéticos como de biossurfactantes, em locais contaminados ou em escala de laboratório promoveram a aceleração do processo de biodegradação (VOLKERING; BREVRE e RULKINS, 1998). Os biossurfactantes apresentam vantagens com relação aos surfactantes por apresentarem baixa toxicidade, biodegradabilidade, além de promoverem maior diminuição da tensão superficial quando comparado ao surfactante sintético (COLLA e COSTA, 2003). Microrganismos com capacidade de produzir biossurfactantes podem ser bons candidatos para propostas de biorremediação (ROMANTSCHUK et al., 2000).

2.3. BIOMONITORAMENTO

Segundo MORI e KONDO (2002), antes de qualquer microrganismo ser utilizado para biorremediação deve-se elucidar a habilidade de degradação e a toxicidade dos produtos metabolizados pelo microrganismo.

A grande preocupação com relação ao uso de agentes biológicos em processos de remediação é o potencial de biotransformação de alguns microrganismos, que pode levar a

formação e o acúmulo de metabólitos intermediários, muitas vezes mais tóxicos do que o composto original. Para a maioria dos compostos orgânicos, parece que a toxicidade é uma combinação da hidrofobicidade e reatividade (MELO e AZEVEDO, 1997).

Ensaio biológicos, também chamados de bioensaios, têm papel importante na identificação de misturas complexas que são potencialmente tóxicas para os seres humanos (ENGWALL e HJELM, 2000). A utilização de bioensaios com espécies (plantas, peixes, algas) sensíveis é feita para estimar concentrações em solo e água; identificar resíduos de herbicidas desconhecidos, ou solo com história de uso de herbicida. O bioensaio faz uso da suscetibilidade das plantas aos compostos químicos (ex. herbicidas) e pode ser verificada através da inibição da germinação de sementes, de raízes ou do crescimento das plantas (sintomas de injúrias). Existem muitas espécies de plantas sensíveis para serem utilizadas como bioindicadoras para vários herbicidas (DOS REIS, 1999) ou outros compostos xenobióticos como HAPs. DOS REIS (1999) verificou a correlação entre os resultados obtidos em bioensaios, utilizando espécies sensíveis aos herbicidas diuron, 2,4-D e ametrina, com técnicas químicas utilizando extração em aparelho soxhlet dos herbicidas e posterior análise por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

As respostas das plantas podem imitar as técnicas químicas, sendo assim é possível utilizar bioensaios para estimar concentrações de contaminantes em amostras, após prévia avaliação da sensibilidade ao composto alvo ter sido realizada (DOS REIS, 1999).

Os bioensaios apresentam baixo custo, rapidez com a vantagem especial de avaliar o potencial ecotoxicológico de resíduos sólidos. Espécies como aveia (*Avena sativa*), rabanete (*Raphanus* sp), alface (*Lactuca sativa*) podem ser empregadas como bioindicadores (FARRÉ e BARCELÓ, 2003).

Segundo MORI e KONDO (2002), há evidências de que a toxicidade do meio diminui quando ocorre a degradação dos compostos alvos. O biomonitoramento pode ser usado como uma eficiente ferramenta para determinar as mudanças na toxicidade durante aplicação de processos de biorremediação de misturas químicas complexas encontradas em locais contaminados com resíduos perigosos (MARTY et al., 1991).

BAUD-GRASSETA; BAUD-GRASSETA e SAFFERMANA (1993) avaliaram a eficiência do processo de biorremediação o qual utilizou linhagens fúngicas em solo contaminado com HAPs. Plantas como alface e aveia foram selecionadas como bioindicadoras e utilizadas para avaliar a redução da toxicidade do solo depois do tratamento fúngico. Os bioensaios foram

utilizados devido à toxicidade de uma mistura complexa de poluentes químicos, muitas vezes, não ser facilmente determinada por análises químicas e o desaparecimento dos compostos alvos pode não indicar destoxificação do solo. Testes de germinação de sementes usando amostras de solo e testes de comprimento de raiz usando os eluatos do solo foram conduzidos com as espécies selecionadas antes e depois do tratamento. Os testes de fitotoxicidade revelaram significativa destoxificação do solo depois do tratamento com uma boa correlação da depressão do composto alvo. Este estudo indicou que os testes de fitotoxicidade apresentam um bom potencial para serem usados como ferramenta ambiental na avaliação da eficiência de uma tecnologia de remediação de locais contaminados.

ROBIDOUX et al. (1998) usaram bioensaios para selecionar amostras de lodos (biosólidos) de estações de tratamento de resíduo. Os biosólidos apresentavam aproximadamente 100 compostos diferentes, mais especificamente compostos orgânicos e inorgânicos derivados de atividades domésticas e industriais. Dentre os contaminantes estavam metais pesados (Zn, Pb e Cd), sulfonados alquilbenzenos lineares, ftalatos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), PCBs, DDE/DDT e PCDD/Fs. Como seria impossível analisar todos os contaminantes do lodo, os pesquisadores avaliaram a toxicidade das amostras utilizando bioensaios com bactérias (Microtox e taxa de respiração bacteriana) e plantas (comprimento da raiz de alface). Os resultados obtidos mostraram que o Microtox apresentou eficiência de 45%, enquanto que os bioensaios utilizando sementes de alface apresentaram 80% de eficiência. Análises estatísticas confirmaram que o comprimento da raiz foi reduzido significativamente em presença das amostras contaminadas pela mistura de compostos permitindo assim a detecção dos mesmos.

ENGWALL e HJELM (2000) avaliaram o consumo de dioxinas em várias espécies de plantas (como cenoura, abóbora, pepino) crescidas em solos contaminados com lodo industrial. O consumo de PCDD/Fs pelas cenouras aumentou com o aumento da quantidade de lodo industrial aplicado no solo, demonstrando uma correlação entre consumo de compostos pela raiz e concentração de contaminantes.

AGGELIS et al. (2003) estudaram a habilidade de linhagens selecionadas de *Pleurotus ostreatus* para produzir enzimas ligninolíticas e remover compostos fenólicos de um resíduo de óleo de oliva (OMW) esterilizado. A toxicidade do OMW foi avaliada usando bioensaios com sementes de *Lactuca sativa*. Os resultados obtidos mostraram que a toxicidade diminuiu significativamente após o tratamento com as linhagens fúngicas.

MALLIK (2004) reportou que o extrato aquoso obtido de compostos fenólicos inibiu a germinação e o crescimento do rabanete e outras sementes, devido à toxicidade dos compostos fenólicos presentes no extrato.

2.4 CONTAMINAÇÃO DOS ALIMENTOS COM PCDD/Fs

A maior exposição do homem (acima de 90%) é atribuída à dieta alimentar, particularmente devido ao consumo de carne, peixe, leite e seus derivados. Os animais acumulam dioxinas e furanos em seus tecidos comestíveis ricos em gorduras, como por exemplo o fígado. Tipicamente as dioxinas e os furanos estão presentes em concentrações de 10 a 100 picogramas (pg, ou 10^{-12} g) por g de alimentos cárneos; em outras palavras, essas substâncias ocorrem em concentrações de poucas partes por quatrilhão (BAIRD, 1995). Contudo, é importante ressaltar que baixas concentrações de dioxinas, exercem geralmente grande efeito tóxico para o homem e animais (BAIRD, 1995). Os alimentos responsáveis pela contaminação humana por dioxinas variam de país a país, dependendo dos hábitos culturais e preferências pelo consumo de determinados produtos.

Durante 1991 e 1992, foram coletados peixes de dois pontos do rio Fraser, British Columbia, Canadá. Amostras de tecidos dos peixes (músculos e fígado) foram analisadas e os resultados obtidos mostraram que as concentrações de dioxinas excederam as concentrações estabelecidas pelo Departamento de Saúde do Canadá (20 ppt ou 20×10^{-2} g/g alimento). As amostras coletadas abaixo do Rio Fraser, próximo ao Lago Willians a 250 km de George Prince, apresentaram concentrações bem menores desses compostos. Esta diferença de concentrações, obtidas nos peixes coletados em 2 pontos diferentes do rio reflete a proximidade ou a distância de fontes contaminantes conhecidas (MC DONALD et al., 1997).

Em 1993, amostras de caribus foram obtidas de 3 bandos no território Yukon (Finlayson, Tay, e Bonnet Plume) e de 4 bandos à noroeste (Bathhust, Sauthampton Island, Cape Dorset e Lake Harbour) do Canadá. A concentração de dioxinas foi maior no tecido gorduroso do que no músculo e fígado; e sendo desprezível no restante dos tecidos. A presença destes compostos no ambiente Ártico foi atribuída ao de transporte atmosférico (HEBERT et al., 1996).

Quarenta e três itens alimentares que foram adquiridos, entre abril e maio de 1994, em mercados no sul do Mississipi, E.U.A, incluindo amostras de ostras, leite, manteiga, queijo, frango, fígado de frango, ovo, carne e lingüiça, foram analisadas. Os resultados obtidos das análises mostraram que as maiores concentrações de PCDD e PCDF foram encontradas em

peixes gato com 10,2 – 27, 8 pg I-TEQ/g. Os limites de concentrações nas outras categorias de alimentos foram muito menores (FIEDLER et al., 1997).

Em 1998, o Departamento de Agricultura dos E.U.A., verificou os níveis de dioxinas em amostras de carne de 13 estações experimentais e encontrou dioxinas em concentrações iguais ou acima do esperado em locais altamente industrializados e estudou o metabolismo de congêneres de dioxinas com ^{14}C . Os resultados preliminares desse estudo indicaram que a localização geográfica pode influenciar as concentrações de dioxina na carne e que, dentre os animais criados para o abate, os touros podem apresentar as maiores concentrações de dioxinas (FEIL e ELLIS, 1998).

Amostras de peixes e sedimentos do Rio Tama, Japão, localizado próximo ao incinerador municipal, foram coletadas em 2 diferentes pontos de amostragem (local poluído e local não poluído). Os peixes e os sedimentos obtidos do local poluído (próximo ao incinerador municipal) mostraram alto valor médio de TEQ, 14,0 pg/g e 12,6 pg/g de PCDD e PCDF, respectivamente. As amostras de sedimentos retiradas do local não poluído, a 1 km da planta e separado por uma barragem, apresentaram valor médio de TEQ de 0,3 pg/g; já os peixes apresentaram valor médio de 7,26 pg TEQ/g coletado, aproximadamente 23 vezes maior do que o sedimento. Os resultados sugerem que a bioconcentração de PCDD e PCDF ocorre nos tecidos dos peixes deste rio (ONODERA et al, 1999).

Na Alemanha houve uma contaminação de carnes, leites e derivados, devido á contaminação da polpa cítrica exportada pelo Brasil contaminada com PCDD/Fs. A polpa cítrica utilizada na ração de gado havia sido contaminada por um lote de cal contaminada com PCDD/F's (ANON ; 1999).

2.5 CONTAMINAÇÕES DE PCDD/FS OCORRIDAS NO BRASIL

No Brasil, a necessidade de monitoramento de PCDD/Fs foi debatida, em especial, a partir de 1998, devido à identificação da contaminação de um lote de cal empregado na cooreção da acidez do farelo de polpa cítrica exportada para a Europa. Essa contaminação foi identificada pelo súbito aumento do teor de PCDD/Fs no leite de vaca, na Alemanha. Após análises de amostras de leite e seus derivados, e dos componentes das rações, foi identificada como fonte de contaminação a ração animal de origem brasileira. Esse episódio causou o cancelamento da importação do produto pela União Européia e, conseqüentemente, houve perda econômica para o país. A exportação foi retomada somente a partir do estabelecimento de legislação brasileira que

normatizou os limites de dioxinas e furanos em tais produtos e impoz o monitoramento contínuo destes contaminantes (CARVALHAES et.al., 2002).

GROSSI; LICHTIG e KRAUBI (1998) avaliaram o nível de PCDD/Fs, PCBs e PAHs em amostras de lixos de diferentes graus de maturação em 21 incineradores municipais brasileiros. O estudo mostrou que as concentrações de PCDD/Fs estavam acima dos níveis aceitáveis na Alemanha, 17 ng I-TEQ/kg, especialmente nas amostras coletadas nas áreas metropolitanas. Para o PCB, a concentração média obtida de seus congêneres, PCB28, 52, 101, 138, 153 e 180, foi aproximadamente 3 vezes menor que as concentrações encontradas em amostras analisadas na Alemanha.

KRAUSS et al. (1999) realizaram estudo para avaliar a contaminação de dioxinas em solos, cimento e pó de forno de cimento, em cimenteiras no Estado do Rio de Janeiro. A quantidade de PCDD/Fs encontrada no solo variou de 0,03 a 6,91 ng I-TEQ / kg.

BRAGA et al. (2002) analisaram amostras de solo, de leite de vacas de fazendas localizadas próximo à uma planta de produção de hexaclorociclohexano (HCH) no Rio de Janeiro. As amostras de solo, do local da fábrica, apresentaram concentrações de PCDD/Fs na ordem de 13.900 ng I-TEQ /kg, enquanto os solos das áreas circunvizinhas à fábrica ficaram na faixa de 0,19 a 2,08 ng I-TEQ/kg. Os níveis de PCDD/Fs nas amostras de leite de vaca variaram de 4,1 a 6,5 ng I-TEQ/kg de gordura de leite.

2.6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos realizados no Brasil utilizando microrganismos e PCBs, compostos muito semelhantes aos PCDD/Fs (PIZA e MANFIO, 2002; PELLIZARI, 2002 e DA COSTA, 2004) e têm demonstrado que em nosso país há uma comunidade microbiana muito rica e com capacidade biodegradativa para esses compostos.

O presente trabalho teve como objetivo selecionar dentre linhagens fúngicas pertencentes à coleção de cultura do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana/UNICAMP, com capacidade biodegradativa já conhecida para compostos xenobióticos (HAPs, plásticos, herbicidas), uma ou mais linhagens capazes de degradar PCDD/Fs presentes em cinzas de incinerador municipal para serem utilizadas, futuramente, em processos de biorremediação.

3 OBJETIVOS

- ✓ Determinar e quantificar PCDD/Fs presentes nas amostras de cinzas coletadas do incinerador municipal na cidade de São Paulo.
- ✓ Selecionar fungos capazes de crescer em meio sólido contendo cinzas contaminadas com PCDD/Fs
- ✓ Selecionar as linhagens possíveis utilizadoras de PCDD/Fs presentes em cinzas.
- ✓ Determinar a produção de enzimas ligninolíticas (LiP, MnP e lacase) pelas linhagens fúngicas pré-selecionadas crescidas em meio líquido contendo cinzas contaminadas com PCDD/Fs;
- ✓ Avaliar o crescimento das linhagens em diferentes concentrações de PCDD/Fs em meio líquido.
- ✓ Avaliar a toxicidade do meio de cultivo durante o tratamento com linhagens fúngicas selecionadas.
- ✓ Determinar a produção de biossurfactantes das linhagens selecionadas;
- ✓ Avaliar a porcentagem de degradação de dibenzofurano e PCDD/Fs e remoção de metais pesados em meio líquido pela(s) linhagen(s) selecionada(s).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CINZAS

As amostras de cinzas foram coletadas no Incinerador Vergueiro, localizado na cidade de São Paulo. As características do Incinerador e a composição do lixo tratado estão apresentadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Características do Incinerador e do lixo tratado.

Características	Descrição
Início de operação	1968
Tipo	Grelhas
Regime de alimentação	Contínuo
Número de câmaras	2
Capacidade nominal	150 ton/dia/câmara
Capacidade efetiva	60 ton/dia
Produção de escória	20%
Altura da chaminé	60 m
Controle de gases	Filtro de partículas
Tipo de lixo	70% lixo hospitalar 20-30% lixo doméstico
Vazão de chorume	Indeterminado
Tipo de tratamento do chorume	Nenhum
Situação atual	Desativado

As amostras coletadas foram colocadas em caixas plásticas, lacradas e armazenadas a 10°C para serem utilizadas posteriormente.

4.2 REAGENTES

Todos os reagentes utilizados tiveram grau analítico, com alto grau de pureza.

O composto dibenzofurano (Aldrich), utilizado como composto modelo em experimentos de degradação, apresentou 99% de pureza.

4.3 PRÉ-TRATAMENTO DAS CINZAS COM ÁCIDO CLORÍDRICO

Uma amostra de 0,5 Kg de cinza foi colocada em uma cuba de vidro, foram adicionados 4L de ácido clorídrico (HCl) 1M (1g de cinza: 8 mL de HCl), a mistura foi agitada durante 2 horas. As cinzas foram separadas do HCl por centrifugação a 3000 G /10 min e lavadas 3 vezes com água destilada, utilizando-se também centrifugação (HITACHI, modelo Himac CR21). A cinza lavada foi mantida por uma noite a 30°C para secagem. Após esse período a amostra foi mantida em frasco de vidro âmbar, com tampa de rosca para posteriormente ser utilizada (WINDAL et al., 1998).

4.4 EXTRAÇÃO ULTRASSÔNICA DE PCDD/Fs

Cinco amostras de 1g de cinza pré-tratada com ácido clorídrico (descrito Item 4.3.) foram pesadas. Após a pesagem, 20 mL de tolueno foram acrescidos em cada tubo contendo as cinzas, e os mesmos foram tampados. Os tubos foram colocados em banho de ultrassom (Ultrasonic Devices- Heat Systems Ultrasonics) durante 1,5h. Esse procedimento foi repetido três vezes para cada amostra. A temperatura do banho foi mantida a $68^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, com auxílio de um ebulidor (BEARD; NAIKWADI e KARASER; 1992).

Todo o extrato obtido das amostras de cinzas foi concentrado em rotaevaporador à temperatura de 74°C . Após todo o volume ter sido evaporado, o balão do rotaevaporador foi lavado com 10 mL de acetona (5x 2mL), previamente esterilizada com filtro de membrana (0,2 μm). O extrato concentrado foi colocado em frasco de vidro âmbar com tampa de rosca e armazenado em freezer para ser utilizado posteriormente em meio sólido.

4.5 MICRORGANISMOS

Foram utilizadas as seguintes linhagens de fungos basidiomicetos pertencentes à Coleção de Culturas do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana: *Agaricus campestris* Iz 1877, *Pleurotus florida*, *Pleurotus* sp, *Pleurotus* sp 016, *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725, *Pleurotus* sp (P1), *Pleurotus* sp. (CCB396), *Pleurotus* sp. (CCB507), *Pleurotus* sp.(CCB394), *Pleurotus sajor-caju* (94/03), *Lentinus edodes*, *Pleurotus tailandia*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus* sp., *Pleurotus* sp. (068), *Pleurotus* sp. (517), *Pleurotus florida*, *Pleurotus sajor-caju* (020 Márcia), *Ceriporiopsis subvermispora* (SS-3) e linhagem FSP 2000.

4.6 MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Os fungos foram repicados em tubos de rosca (Marca Pirex ® n° 9825) contendo meio MA (extrato de malte - ágar, 2%) e foram crescidos em estufa a 30°C, com exceção do *Ceriporiopsis subvermispota* que foi cultivado a temperatura ambiente. Após 7 dias de crescimento, os fungos foram colocados em câmara fria a 10° C.

4.7 PRÉ- SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS

4.7.1 Preparo do inóculo

Os fungos contidos em tubos foram repicados em placas contendo meio MA e incubados em estufa a 30°C, com exceção do *Ceriporiopsis subvermispota*, o qual foi cultivado a temperatura ambiente. O tempo de incubação foi de 7 dias, tempo necessário para que o micélio preenchesse toda a placa. O procedimento para a padronização dos inóculos consistiu em quadricular o meio de cultivo das placas em quadrados de 1,0 cm x 1,0 cm.

4.7.2 Crescimento em meio sólido

Foram distribuídos, com auxílio de pipeta volumétrica, 20mL de meio MA em cada tubo de rosca (Marca Pirex ® n° 9825) e após terem sido distribuídos os meios, os mesmos foram esterilizados durante 15 min/ 121°C. Após a esterilização, o meio contido nos tubos foi vertido em placas de Petri (20mL/ placa). Para preparar as placas com cinzas, foi adicionado ao meio ainda quente 2,5g de cinzas tratadas com HCl (Item 4.3), após o mesmo ter sido autoclavado. Para as placas contendo as dioxinas extraídas (extratos concentrados, Item 4.4), foi adicionado 200µL de extrato concentrado ao meio ainda quente, após a esterilização. Nas placas controles, somente meio MA foi colocado. Após a solidificação dos meios os fungos foram inoculados (1 quadrado de 1cm x 1 cm/ placa). Esse experimento foi realizado em triplicata.

4.8 SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS

4.8.1 Crescimento em meio líquido contendo cinzas

O crescimento foi realizado em frascos Erlenmeyers (125 mL) contendo 50 mL de meio básico, conforme descrito na Tabela 4.2.

Após a esterilização do meio líquido básico a 121°C durante 15 minutos, foi adicionada a vitamina tiamina (1,0mL de tiamina/ L meio básico). A vitamina tiamina foi preparada separadamente obtendo-se uma concentração de 2,0 mg/ mL, esterilizada por filtração em membrana Millipore (0,22 µm) e estocada em geladeira. Após a adição da tiamina, o meio foi distribuído nos frascos Erlenmeyers e os fungos foram inoculados. Em cada frasco Erlenmeyer foram inoculados 5 quadrados de 1 cm x 1cm (1 quadrado /10mL de meio) dos inóculos (Item 4.7.1.).

Tabela 4.2. Composição do Meio Líquido Básico em 1L de água destilada, pH final de 5,0.

Componentes	Quantidade (para 1 L)
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0,5 g
KH_2PO_4	0,8 g
K_2HPO_4	0,3 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,004g
MnSO_4	0,005
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0055 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,005 g
CoSO_4	0,002 g
Extrato de levedura	0,2 g

Os frascos foram tampados com tampão de algodão e mantidos em estufa a 30°C durante 3 dias. Após esse período, adicionou-se a cinza, previamente pesada, para obter as concentrações de 50 g/L; 70 g/L, 90 g/L, 130 g/L, 170 g/L, 210 g/L e 250 g/L. Após a adição das cinzas, os tampões de algodão foram substituídos por tampas de borracha para impedir a perda dos compostos voláteis e evitar a exposição humana aos compostos presentes nas cinzas. Os frascos foram oxigenados com O₂ sintético durante 1 min com vazão de 1mL /min. A oxigenação foi feita a cada 7 dias. Os frascos foram colocados em estufa com temperatura de 30°C (t₀). As

amostras foram coletadas após 3 (t_3), 7(t_7), 14(t_{14}), 21(t_{21}), 28 (t_{28}), 35 (t_{35}) e 42 (t_{42}) dias após a adição das cinzas. O experimento foi feito em triplicata.

As amostras coletadas foram centrifugadas a 32.000 G durante 15 min a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e transferidos para frascos estéreis e armazenados a -10°C para posteriormente serem utilizados para a determinação enzimática e testes toxicológicos. Os sedimentos (massa micelial + cinzas) obtidos após a centrifugação também foram coletados e armazenados em frascos de vidro âmbar estéreis para determinação da toxicidade.

4.9 DETERMINAÇÃO DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

Os sobrenadantes, obtidos dos experimentos realizados em meio líquido de sais minerais contendo cinzas foram utilizados para a determinação das atividades enzimáticas a partir do cálculo da diferença de absorbância, medida em espectrofotômetro:

4.9.1 Atividade da Lignina Peroxidase

Esta atividade foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico ($\epsilon_{310} = 9.300 \text{ 1/M} \times \text{cm}$). A mistura da reação foi composta de 0,6 mL de caldo filtrado; 0,2 mL de H_2O_2 2mM e 0,2 mL de uma solução de álcool veratrílico 2,0 mM em tampão tartarato de sódio 0,4 M (pH 3,0). A reação foi iniciada pela adição de H_2O_2 e o aparecimento do aldeído veratrílico foi determinado lendo-se a absorbância a 310 nm, durante 10 min (TIEN e KIRK, 1984)

4.9.2 Atividade da Manganês Peroxidase

Esta atividade foi quantificada pela oxidação do vermelho de fenol ($\epsilon_{610} = 4.460 \text{ 1/M} \times \text{cm}$), na presença de manganês e peróxido de hidrogênio. A mistura da reação foi composta de 0,5mL de caldo filtrado; 0,1mL de lactato de sódio 0,25M; 0,05 mL de MnSO_4 2,0mM; 0,2mL de albumina bovina 0,5%; 0,1mL de vermelho de fenol 0,1%; 0,05mL de peróxido de hidrogênio 2,0mM em tampão succinato 0,2M (pH 4,5). A mistura foi mantida a 30°C durante 5 minutos, sendo a reação da formação do cromóforo finalizada pela adição de 0,04mL de NaOH 2,0 mol.L⁻¹. Após a adição do NaOH, a absorbância foi determinada em 610nm (KUWAHARA et al, 1984).

4.9.3 Atividade da Lacase

Para determinar esta atividade (SZKARZ et al, 1989- modificado) foi utilizada a siringaldazina como substrato enzimático. A mistura de reação foi composta de: 0,6mL de caldo;

0,2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 3,0); 0,1 mL de siringaldazina 1 mM em etanol; 0,1 mL de água destilada. A oxidação da siringaldazina ($\epsilon_{525} = 65.000 \text{ l/M} \times \text{cm}$) até sua forma quinona foi acompanhada durante 10 minutos em 525 nm.

4.10 DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE

4.10.1 Avaliação da sensibilidade das sementes aos PCDD/Fs

Foram avaliadas sementes de ervilha (*Pisum sativum*), rabanete (*Raphanus sativum*), pepino (*Cucumis sativus*), cenoura (*Daucus carota*) e alface (*Lactuca sativa*). Para cada espécie avaliada foram utilizadas 50 sementes por placa. O teste foi realizado em duplicata.

Para avaliar a sensibilidade, utilizou-se amostras dos sobrenadantes dos controles abióticos (sais minerais + cinzas sem microrganismo) coletadas após 3 dias da adição das cinzas. Os bioensaios foram realizados de acordo com o Item 4.10.2.

4.10.2 Bioensaio com sementes de alface

Alíquotas de 2mL dos sobrenadantes das amostras foram utilizadas para umedecer os discos de papel de filtro colocados no interior das placas de Petri. Como controle utilizou-se água destilada estéril. Foram colocadas 50 sementes em cada placa (DUKA, 1989).

As placas foram incubadas a temperatura ambiente cobertas com papel alumínio e mantidas dentro da capela de exaustão de gases. Após 48 horas o tamanho das radículas germinadas foi medido com auxílio de uma régua. O teste foi realizado em triplicata.

O cálculo da porcentagem do efeito fitotóxico, redução do comprimento da radícula, foi feito de acordo com a equação 1:

$$\% \text{ Efeito} = \frac{(\text{comp. médio da radícula no controle} - \text{comp. médio da radícula na amostra})}{\text{comprimento médio da radícula no controle}} * 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Para a avaliação da toxicidade da cinza durante o tratamento, o sedimento coletado de cada amostra tratada durante o experimento (cinza + massa micelial) foi transferido cuidadosamente para placas de Petri, previamente esterilizadas, e distribuído em toda a superfície da mesma. As amostras foram secas durante 24 horas em temperatura ambiente. Após a secagem das mesmas foram distribuídas 50 sementes/ placa e adicionados 2 mL de água destilada

previamente estéril (121°C/ 15 min). O bioensaio foi procedido conforme descrito na metodologia acima. O teste também foi realizado em triplicata.

4.10.3 Dose – resposta utilizando sementes de alface.

Com o objetivo de verificar se a diminuição dos compostos no meio líquido poderia causar uma diminuição do efeito fitotóxico nas sementes de alface, foram realizados testes para verificar a sensibilidade da planta a diferentes concentrações dos compostos.

No primeiro teste, uma solução estoque de dibenzofurano (marca Aldrich com 99,9% IA) foi preparada de forma a obter uma concentração de 10.720 mg/L, utilizando etanol como solvente. A partir da solução estoque foram feitas 4 diluições, usando água destilada, obtendo-se as seguintes concentrações: 21,44 ppm; 10,72 ppm; 5,36 ppm e 2,68 ppm. Cada diluição foi feita em balão volumétrico de 10 mL. As soluções foram utilizadas em bioensaios com sementes de alface (item 4.10.2).

Para o segundo teste, foi utilizada uma amostra de controle abiótico, referente ao primeiro dia de coleta (t_3). A partir dessa amostra foram feitas as seguintes diluições: 1:1 (v/v) controle abiótico: água destilada; 1:4 (v/v) controle abiótico: água destilada e 1:8 (v/v) controle abiótico: água destilada e controle abiótico sem diluição. O teste foi feito em triplicata. O bioensaio empregado foi realizado conforme item 4.10.2.

4.11 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

A produção de biossurfactante foi avaliada pela determinação da tensão superficial nos sobrenadantes utilizando-se tensiômetro da marca Krüss pelo método de anel de Dunuoy (JONHSON et al, 1992).

4.12 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO DIBENZOFURANO

O fungo foi cultivado em meio líquido básico conforme descrito no item 4.8.1. Após 3 dias de crescimento do fungo, adicionou-se 40µL da solução estoque de dibenzofurano para obter uma concentração final de 110,88 µg/L no meio de cultivo. Após a adição do dibenzofurano no meio, os tampões de algodão foram substituídos por tampões de borracha. Os frascos foram oxigenados em intervalos de 7 dias. Foram feitas coletas 3, 7, 14, 21 e 28 dias após adição do composto no meio de cultivo. As amostras coletadas foram utilizadas em microextração em fase sólida (SPME) (Item 4.14) e análise por cromatografia gasosa (Item 4.15), para determinação da

porcentagem de degradação do dibenzofurano. Os experimentos foram realizados em triplicatas, sendo feitas amostras controles contendo somente meio líquido com adição de dibenzofurano, sem microrganismos (controle abiótico).

O cálculo da porcentagem de degradação do dibenzofurano foi realizado de acordo com a equação n° 2. Os valores das áreas obtidas nos cromatogramas, referentes ao tempo de retenção do composto dibenzofurano, obtidos das análises por cromatografia gasosa (CG) foram utilizados para o calcular a porcentagem da degradação

$$\% \text{ Degradação} = \frac{(\text{área dibenzofurano controle} - \text{área dibenzofurano. amostra})}{\text{área dibenzofurano controle}} * 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Essa etapa do trabalho foi realizada em colaboração com o laboratório de Cromatografia Gasosa do Instituto de Química da UNICAMP, e esteve sob supervisão do Prof. Dr. Fábio Augusto.

4.12.1 Solução estoque de dibenzofurano

Para solução estoque pesou-se 0,0069 g de dibenzofurano (Aldrich, 99% pureza) em balança analítica e transferiu-se a massa para um balão volumétrico de 50 mL, completando com água destilada.

4.13 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE PCDD/FS E REMOÇÃO DE METAIS PESADOS.

O fungo foi cultivado em meio líquido básico conforme descrito no Item 4.8.1. Após 3 dias de crescimento foram adicionados 3,5 g de cinzas/frasco (70g/L). Foram feitas somente duas coletas: uma após a primeira semana e a outra somente após 64 dias de cultivo. O experimento foi feito em triplicata. Como controle foram preparados frascos erlenmeyers contendo meio básico estéril e 70 g/L de cinzas, sem adição de microrganismo.

O cálculo da porcentagem de degradação dos PCDD/Fs foi realizado de acordo com a equação n°2.

4.14. MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

Utilizou-se uma fibra recoberta com 100 μm de espessura de polidimetilsiloxano (PDMS, apolar) conectada a um aplicador 5-7330 (Supelco Bellefont –PA , EUA). As fibras foram acondicionadas antes do uso segundo as instruções do fabricante e, entre extrações, as fibras foram mantidas por 3 min no injetor aquecido do CG para eliminar possíveis resíduos que poderiam interferir nos resultados.

Com auxílio de pipeta automática foram coletados 2 mL do sobrenadante de cada amostra e transferidos para um frasco de vidro de fundo reto (10 mL) contendo 2 mL de solução de NaCl 36% (36 g NaCl/ 100 mL água). Colocou-se dentro de cada frasco uma microbarra de agitação de teflon (3mm de diâmetro e 5 mm de comprimento) e o mesmo foi tampado com tampa de rosca contendo septo de teflon. O frasco foi colocado em agitador magnético e a solução foi mantida sob agitação durante 10 min/ 1200 rpm. Após o término do tempo de equilíbrio, a fibra foi introduzida no frasco e mantida no *headspace* durante 10 minutos (tempo de extração), conforme está demonstrado na Figura 4.1

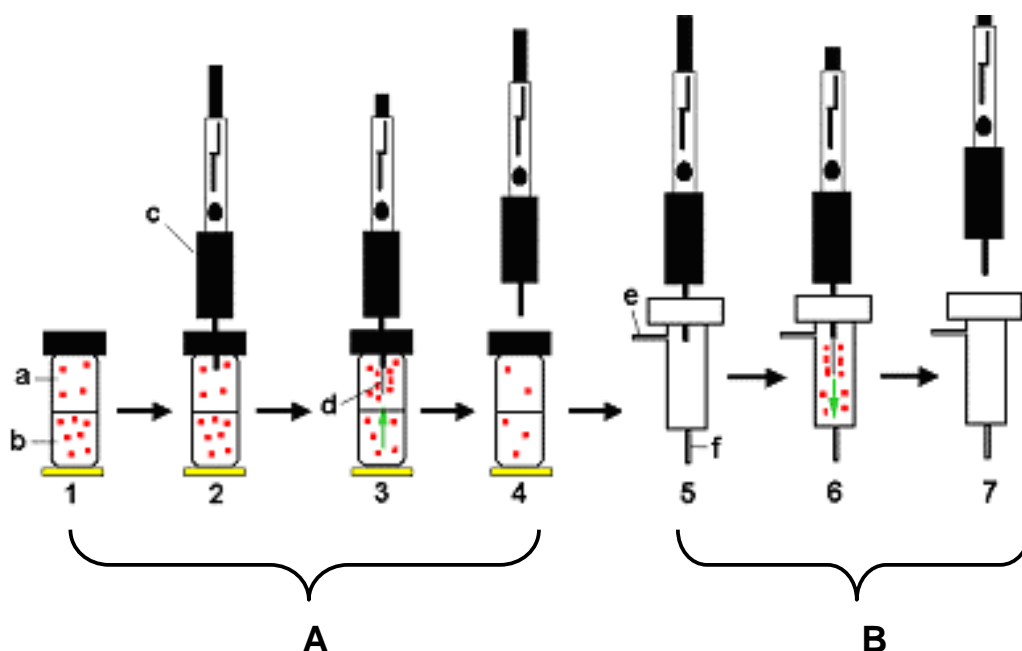


Figura 4.1. Procedimento básico para microextração em fase sólida: a = *headspace*; b= amostra; c = aplicador da fibra extratora, e = entrada de gás de arraste e f = coluna cromatográfica. **A** = Extração; e **B** = dessorção. 1 = Saturação do *headspace*; 2 = perfuração do septo do frasco de amostra; 3 = exposição da fibra de SPME/ extração dos analitos; 4 = retração da fibra para o interior da agulha hipodérmica; 5 = perfuração do septo do injetor do CG; 6 = exposição da fibra/ dessorção dos analitos; e, 7 = retração da fibra para o interior da agulha.

4.14.1 Tempo de equilíbrio da extração

Foram avaliados os seguintes tempos de extração: 1 min; 3 min; 5 min; 10 min; 20 min e 40 min. O procedimento de SPME foi realizado conforme descrito no item 4.14, variando somente o tempo de exposição da fibra no *headspace* da amostra (extração).

4.15. ANÁLISE DO DIBENZOFURANO POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Foi utilizado um cromatógrafo gasoso marca Hewlett- Packard, HP 6850, equipado com detector de ionização de chama (FID). Uma coluna capilar marca HP-5 (30 m X 0,25 mm X 0,25 µm de espessura do filme) foi empregada. O software HP ChemStations foi usado para tratamento dos dados.

A temperatura inicial do forno foi de 140°/ 2min, e após esse tempo a temperatura foi aumentada para 200°C/ 8 min. A temperatura de injeção foi de 250°C e a temperatura do detector foi programada para 290°C. Utilizou-se injeção tipo *splitless* pulsado (5 min tempo de *splitless*). Como gás de arraste foi utilizado o hélio, sendo o fluxo mantido constante á 1,2 mL/min.

As condições cromatográficas utilizadas para análise do dibenzofurano foram otimizadas em laboratório

4.16. ANÁLISE DE PCDD/FS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA EM ESPECTRÔMETRO DE MASSA (CG/EM) DE ALTA RESOLUÇÃO

A determinação dos teores de todos os congêneres (2378), bem como o total de PCDDs e PCDFs, foi realizada por cromatografia gasosa acoplada por espectrofotometria de massa (CG/EM) de alta resolução. Todos os procedimentos analíticos (extração, limpeza e identificação e quantificação dos PCDD/Fs) foram realizados seguindo-se o procedimento de operação laboratorial padrão e protocolos internacionais números 8290 e 1613 da EPA dos Estados Unidos (US EPA 1994).

4.16.1 Análise por CG/EM

Foi utilizado um espectrômetro de massa VG Autospec Ultima acoplado a um cromatógrafo gasoso HP 6890. O sistema de dado foi VG OPUS. As amostras foram injetadas com o auxílio de um injetor automático HP 7673.

Os parâmetros utilizados no espectrômetro de massas durante as análises de amostras estão descritos na Tabela 4.3.

Utilizou-se uma coluna de 30m J&W DB5-ms, 0,25µm de diâmetro interno, pressão na cabeça da coluna de 10 psi, fluxo constante. Programação da temperatura 70° por 4 minutos, 15°C/ min até 220°C, 1,5 °C / min até 240°C, isoterma por 2 minutos, 45°C/min até 310°C, isoterma final de 10 min. A temperatura de injeção foi 300° C, modo sem divisão de fluxo, tempo de abertura da válvula de 2 min condições de injeção. Padrões internos isotopicamente estáveis foram adicionados em concentrações definidas às amostras anteriormente aos processos de extração e limpeza.

Tabela 4.3. Condições do Espectrômetro de Massas

Descrição	Condições
Poder de resolução	5000 (10% definição de vale)
Condições da fonte	Energia de elétron 30 eV, Corrente 700µA. Temperatura da fonte 250°C
Temperatura da interface	280°C
Condições do Detector	Amplificador 10 ⁻⁶ Amps escala total. Tempo de resposta do amplificador de 0.01 ms. Voltagem do multiplicador 320volts

4.17 ANÁLISE DE METAIS PESADOS

4.17.1 Mercúrio

A amostra foi digerida em meio ácido e permanganato de potássio em um banho-Maria a uma temperatura de aproximadamente 50°C. A solução resultante foi analisada utilizando-se técnica de espectrometria de absorção atômica, equipamento marca GBC, modelo Avanta PMC e preparadas por Gerador de Hidretos – vapor frio, equipamento marca GBC modelo HG 3000.

4.17.2. Demais Metais

As amostras para análise de metais foram digeridas em meio ácido sob aquecimento, e a solução resultante foi analisada utilizando-se a técnica de Espectrometria de Emissão Atômica com plasma de argônio induzido – ICP-OES. O equipamento utilizado para as análises foi espectrômetro de emissão atômica com plasma de argônio induzido marca Perkin Elmer , modelo Optima 2000.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 DETERMINAÇÃO DE PCDD/FS NAS AMOSTRAS DE CINZAS

Após as amostras de cinzas serem coletadas no incinerador municipal realizou-se a determinação e quantificação de PCDD/Fs.

Os valores obtidos dos congêneres das classes das dioxinas e furanos com cloro ligado nas posições 2, 3, 7 e 8; e os equivalentes tóxicos, de cada compostos calculado com base no I- TEF presentes na cinza estão mostrados na Tabela 5.1.

As dioxinas com alto número de cloração, como o OCDD (1600 ng/kg) e o 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD (440 ng/kg) foram os compostos mais abundantes nas amostras de cinzas, os quais apresentam menor toxicidade em relação aos demais compostos dessa classe. O mesmo comportamento foi observado para os compostos da classe dos furanos, onde a quantidade de compostos detectada aumentou com o aumento do número de cloros substituídos. As maiores quantidades detectadas foram 580 ng/kg para o 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF e 230 ng/kg para o OCDF. A formação de compostos da classe das dioxinas e dos furanos com alto número de cloros substituídos em incineradores municipais é bem documentada (TAKADA et al., 1999). A quantidade detectada de dioxinas totais nas amostras de cinzas foi muito maior que a quantidade encontrada em amostras de ar coletadas nas proximidades (distância aproximada de 500m) do incinerador municipal por OLIVEIRA (1996). Porém os resultados obtidos das análises das cinzas foram muito menores que os resultados obtidos por CHANG e CHUNG (1998), onde os níveis totais determinados de PCDD/F de amostras de cinzas coletadas de 3 incineradores municipais em Taiwan variaram entre 41,0 ng/g a 734,24 ng/g.

O resultado do fator tóxico equivalente total da amostra foi de 62 ng I- TEQ/kg, sendo superior também ao nível de PCDD/F encontrados em amostras de vegetação (0,33 a 1,98 ng I- TEQ/ kg) e solo (1,22 a 34,8 ng I-TEQ/kg) coletadas próximo a um velho incinerador municipal (San Adrià del Besòs, Barcelona, Espanha) (SCHUMACHER et al.; 2000).

A Tabela 5.2 mostra os Fatores Tóxicos Equivalentes (TEFs) adotados pela EPA dos Estados Unidos (US EPA) e pela Comunidade Européia (EC), para calcular os equivalentes tóxicos (I- TEQs).

Estes valores de TEF são tabelados para os congêneres de dioxinas, furanos e bifenilas policloradas (PCBs). O 2,3,4,7-TCDD tem um TEF de 1,0 e todos os outros congêneres têm

valores de TEF menores, entre 0,5 a 0,00001. Os Fatores Tóxicos Equivalentes (TEFs) da EPA dos Estados Unidos (US EPA) e da Comunidade Européia (EC) (também conhecido como I-TEF) foram utilizados para a obtenção do teor equivalente total (I-TEQ) de dioxinas e furanos para todos os congêneres.

Tabela 5.1. Homólogos de dioxinas e furanos presentes na cinza, determinados por CG/EM de alta resolução e seus respectivos TEQs.

Compostos	Quantidade (ng/kg)	Equivalentes tóxicos (I-TEQ)
<i>DIOXINAS</i>	(ng/kg)	
2,3,7,8-TCDD	1,5	1,5
1,2,3,7,8-PeCDD	14	7,2
1,2,3,6,7,8-HxCDD	41	4,1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	26	2,6
1,2,3,4,6,7,8-Hp CDD	440	4.4
OCDD	1600	1,6
TOTAL DE DIOXINAS TEQ		24
<i>FURANOS</i>	(ng/kg)	
2,3,7,8-TCDF	3,8	0,38
1,2,3,7,8-PeCDF	10	0,52
2,3,4,7,8-PeCDF	27	13
1,2,3,4,7,8-HxCDF	39	3,9
1,2,3,6,7,8-HxCDF	39	3,9
2,3,4,6,7,8-HxCDF	88	8,8
1,2,3,7,8,9-HxCDF	8,5	0,85
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	580	5,8
1,2,3,4,7,8,9- HpCDF	12	0,12
OCDF	230	0,23
TOTAL DE FURANOS TEQ		38
TOTAL TEQ		62

TCDD= tetraclorodibenzo-*p*-dioxina; PeCDD= pentaclorodibenzo-*p*-dioxina, HxCDD = hexaclorodibenzo-*p*-dioxina, HpCDD = Heptaclorodibenzo-*p*-dioxina, OCDD = octaclorodibenzo-*p*-dioxina, TCDF = tetraclorodibenzofurano , PeCDF = pentaclorodibenzofurano, HxCDF= hexaclorodibenzofurano, HpCDF= heptaclorodibenzofurano, OCDF= octaclorodibenzofurano.

Tabela 5.2. Fatores Tóxicos Equivalentes (I- TEFs)

Compostos	Fatores Equivalente tóxicos
Dioxina 2,3,7,8-Isômero	I- TEF
2,3,7,8-TCDD	1,0
1,2,3,7,8-PeCDD	0,5
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01
OCDD	0,001
Furano 2,3,7,8-Isômero	I- TEF
2,3,7,8-TCDF	0,1
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05
2,3,4,7,8- PeCDF	0,5
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1
1,2,3,6,7,8- HxCDF	0,1
1,2,3,7,8,9- HxCDF	0,1
2,3,4,6,7,8- HxCDF	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01
OCDF	0,001

5.2 PRÉ-SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS

O crescimento dos fungos em meio sólido contendo MA e cinzas, MA e extrato de cinzas e somente meio MA (controle) foi acompanhado durante 7 dias e o aumento do diâmetro da colônia foi observado diariamente. Na Figura 5.1 pode - se verificar a coloração final do meio MA adicionado de cinzas, após esterilização.



Figura 5.1. Placa contendo meio MA e cinzas, sem inóculo.

Após 7 dias de crescimento os fungos *Ceriporiopsis subvermispora* SS-3, *Pleurotus* sp Florida 001, *Pleurotus* sp Florida, *Pleurotus* sp 016, *Pleurotus* CCB396, *Pleurotus* CCB507, *Pleurotus* CCB394, *Pleurotus* CCB016, *Pleurotus* CCB517 e a linhagem FSP 2000 não apresentaram bom crescimento nas placas contendo meio MA e cinzas (menor diâmetro da colônia ou inibição do crescimento), quando comparados com a placa controle (meio MA), indicando que mesmo contendo extrato de malte no meio, a presença de substâncias tóxicas provenientes das cinzas, impossibilitou o desenvolvimento desses microrganismos.

Na Figura 5.2 é possível observar a inibição de crescimento ocorrida com *Pleurotus* sp 016, e também para a maioria dos microrganismos citados acima.



Figura 5.2. Crescimento de *Pleurotus* sp 016, após 7 dias em meio MA (A), meio MA contendo cinzas (B) e meio MA contendo extratos de cinzas (C).

Essa inibição possivelmente foi ocasionada pela presença de compostos tóxicos nas cinzas (PCDD/Fs, metais pesados). Nas placas que continham meio MA e extratos de cinzas, o crescimento foi semelhante ao obtido com as placas controles, sugerindo que os extratos apresentaram PCDD/Fs em concentrações extremamente diluídas ou ausentes, indicando que o processo de extração dos mesmos não foi eficiente ou ainda que houve perda dos mesmos durante o processo de extração e concentração. Sendo assim, o crescimento dos fungos foi atribuído à presença do extrato de malte presente no meio MA.

Alteração morfológica foi verificada nas placas com cinzas onde o fungo *Lentinus edodes* foi inoculado (Figura 5.3), sendo observada a inibição de crescimento do fungo e alteração na coloração do inóculo em todas as replicatas. Esse comportamento sugere que houve adsorção das substâncias tóxicas presentes nas cinzas pelo fungo e pelo quadrado de meio inoculado.

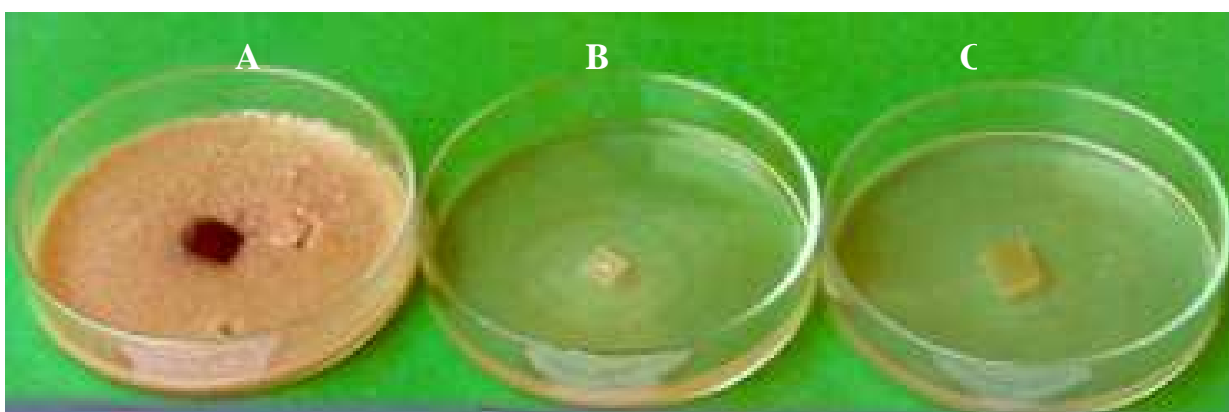


Figura 5.3. Crescimento de *Lentinus edodes*, após 7 dias em meio MA contendo cinzas (A), meio MA (B) e meio MA contendo extrato de cinzas (C).

Alguns microrganismos apresentam a capacidade de adsorver compostos tóxicos do meio, e são utilizados para retirar poluentes presentes em água fazendo assim a destoxificação do meio ambiente. Porém no caso do *Lentinus edodes* essa adsorção de poluentes tóxicos presentes nas cinzas não favoreceu o crescimento do mesmo, ao contrário, o mesmo teve seu crescimento inibido após a adsorção.

Observando o crescimento deste fungo em placa controle verificou-se que o mesmo apresentou crescimento lento em relação aos demais fungos. Nas placas contendo extrato de cinzas, o crescimento do *Lentinus edodes* foi similar ao crescimento observado nas placas controles, sugerindo que os extratos das cinzas não apresentavam as dioxinas em concentrações suficientes para causarem efeito tóxico.

Os fungos *Agaricus campestris* Iz 1877, *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725, *Pleurotus* sp PSC 94/03, *Pleurotus tailandia*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus* sp CCB068 e *Pleurotus sajor-caju* 020 apresentaram crescimento ótimo em todos os meios avaliados quando comparados com as demais linhagens avaliadas. Em alguns casos as hifas cresceram em toda a superfície do meio, chegando até a preencher as bordas da placa. A Figura 5.4 mostra o crescimento do *Pleurotus tailandia*, após 7 dias em meio contendo MA e cinzas, somente meio MA e MA e extrato de cinzas.

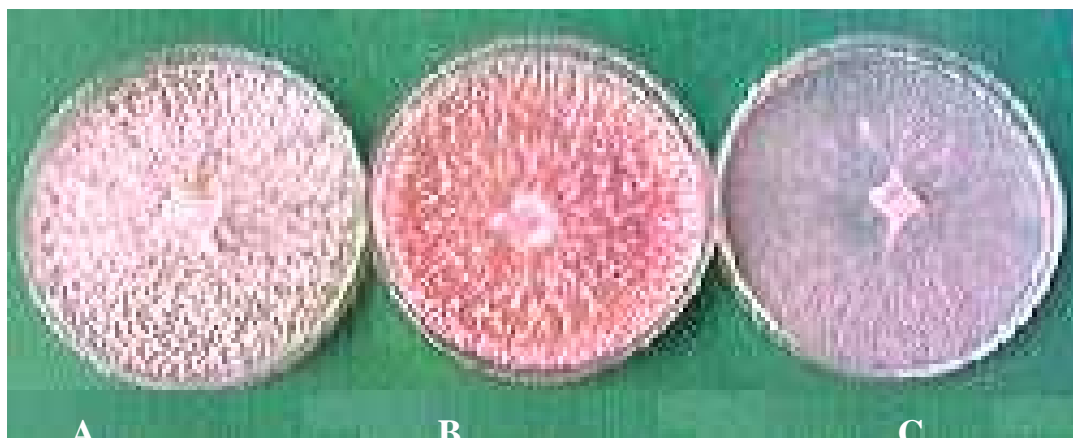


Figura 5.4. Crescimento de *Pleurotus tailandia* após 7 dias em meio MA (A), meio MA contendo cinzas (B) e meio MA contendo extratos de cinzas (C).

Observa-se que o *Pleurotus tailandia* cresceu em todos os meios avaliados, porém o maior crescimento foi obtido na placa controle (meio MA). Deve-se ressaltar que as cinzas além de apresentarem PCDD/Fs continham metais pesados tais como chumbo, cádmio, cromo e possivelmente outros compostos (ex. HAPs, PCBs), tornando esse substrato muito tóxico para os microrganismos. Foi observado também que placas contendo extrato de cinzas apresentavam as hifas menos densas.

O crescimento de todos os fungos em extrato de cinzas foi semelhante ao observado nas placas controle, demonstrando que o extrato não produziu efeitos significativos, como inibição ou diminuição do diâmetro da colônia para os microrganismos. Esse fato sugeriu que o processo de extração escolhido não foi eficiente, produzindo extratos com níveis de PCDD/Fs extremamente baixos.

Como os extratos das cinzas não estavam produzindo efeitos e, conseqüentemente, não estavam auxiliando na seleção dos microrganismos, os mesmos foram descartados e os experimentos seguintes foram realizados somente com as cinzas.

Os fungos que não apresentaram crescimento satisfatório em meio MA contendo cinzas foram eliminados e os fungos que apresentaram crescimento nesse meio semelhante ou superior ao controle foram pré-selecionados. Os fungos pré-selecionados: *Agaricus campestris* Iz 1877, *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725, *Pleurotus* sp PSC 94/03, *Pleurotus tailandia*, *Pleurotus sajor-caju*, *Pleurotus* sp. CCB068 e *Pleurotus sajor-caju* 020 foram utilizados nos experimentos seguintes.

5.3 SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS

5.3.1 Crescimento e produção de enzimas lignolíticas

As linhagens pré-selecionadas foram crescidas em meio líquido contendo amostras de cinzas para obter as concentrações 50 g/L, 70 g/L e 250 g/L , como fonte principal de carbono e energia.

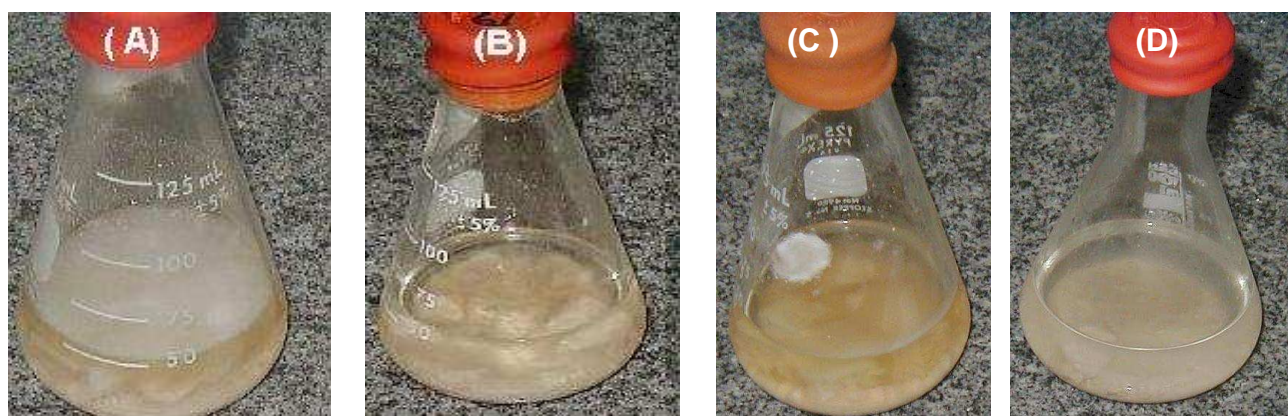


Figura 5.5. Crescimento dos fungos após 5 dias em meio líquido contendo sais minerais e 70 g/L de cinzas. (A) = *Pleurotus* sp CCB068, (B) = *P. tailandia*, (C) = *Pleurotu sajorcaju* 20 (D) = controle abiótico

As 7 linhagens não cresceram em meio contendo 250 g/L de cinzas, sendo esta concentração considerada inibitória para esses microrganismos. Já as linhagens inoculadas em meio líquido contendo 70 g/L de cinzas apresentaram um crescimento maior ao obtido em meio contendo 50 g/L. Quando os fungos *P. sp* CCB 068, *P. chrysosporium*, *P. sp.* 94/03 e *P. sajor caju* foram inoculados em meio contendo 70 g/L de cinzas houve crescimento rápido dos mesmos

e o aparecimento de massa micelial na superfície após 5 dias de crescimento. Já *P. sajor caju* 020, *Agaricus campestris* e *P. tailandia* não apresentaram massa micelial na superfície do meio neste período conforme mostra a Figura 5.5.

Os resultados das produções das enzimas LiP, MnP e lacase obtidas pelas 7 linhagens crescidas em meio líquido contendo cinzas são mostrados nas Tabelas 5.3, 5.4, 5.5; respectivamente.

A produção LiP em meio de cultivo das 7 linhagens crescidas em meio líquido contendo 50g/L e 70g/L de cinzas é mostrada na Tabela 5.3. As maiores atividades LiP foram produzidas pelos fungos *Pleurotus* sp. PSC 94/03 ($4,62 \pm 0,1$) e *Pleurotus sajor- caju* 20 ($4,56 \pm 0,02$) após 42 dias de cultivo em meio líquido contendo 50g/L de cinza. O fungo *Pleurotus* sp. CCB068 apresentou as menores atividades de LiP durante o período avaliado para as duas condições estudadas. Para o fungo *Pleurotus* sp CCB068 a adição de 70g/L de cinzas não apresentou efeito relevante na produção de LiP durante o período avaliado. Quando o fungo *Pleurotus* sp. CCB068 foi cultivado em meio contendo 70g/L de cinzas, houve produção de LiP somente nas duas primeiras semanas do estudo, após essa data a LiP não foi mais detectada. O mesmo perfil de produção de LiP foi observado quando o fungo foi cultivado em meio contendo 50g/L de cinzas. O fungo *Pleurotus tailandia* produziu LiP em praticamente todos os dias avaliados, exceção para o 21º dia de cultivo, em meio contendo 70g/L de cinzas, fato que não foi verificado quando o mesmo foi cultivado em meio contendo 50g/L de cinzas. A maior atividade desta enzima produzida foi após 3 dias de cultivo do *Pleurotus tailandia* em 70g/L de cinzas. O aumento da quantidade de cinzas pareceu ter favorecido produção de LiP para *Pleurotus tailandia*.

O mesmo comportamento ocasionado pelo aumento da quantidade de cinzas adicionadas ao meio de cultivo também foi verificado para as linhagens *Agaricus campestris*, *Pleurotus sajor- caju* e *Phanerochaete chrysosporium*. Para as linhagens *Pleurotus* sp. CCB068, *Pleurotus sajor- caju* 020 e *Pleurotus* sp. PSC 94/03, a adição de 70 g/L não favoreceu o aumento da atividade de LiP em todo período avaliado.

Tabela 5.3. Atividade de LiP (U/L) determinada durante 42 dias de cultivo das 7 linhagens em meio líquido contendo 50g/L e 70 g/L de cinzas. * = feito em duplicata, não foi calculado o desvio padrão, ND = não determinado

Tempo(dias)	Cinzas	Atividade de LiP (U/L) para as diferentes linhagens						
		068	PT	94/03	PSC	20MA	BPC	BAC
3	50g/L	0,33 ± 0,08	0,10 ± 0,02	0,78 ± 0,39	0,70 ± 0,02	0,19 ± 0,03	0,11 ± 0,05	1,07 ± 0,40
	70g/L	0,19 ± 0,33	2,13 ± 1,96	0,90 ± 0,43	ND	1,22 ± 1,18	1,85 ± 0,49	2,64 ± 1,10
7	50g/L	0,89 ± 0,10	ND	ND	ND	0,05 ± *	ND	ND
	70g/L	0,11 ± 0,10	0,88 ± 0,68	2,04 ± 1,25	0,70 ± 1,22	0,40 ± 0,25	1,01 ± 0,92	0,18 ± 0,31
14	50g/L	0,01 ± 0,01	0,05 ± 0,05	0,02 ± 0,03	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,02	0,05 ± 0,01
	70g/L	0,34 ± 0,29	0,04 ± 0,07	0,34 ± *	1,32 ± 1,27	2,64 ± 0,94	ND	ND
21	50g/L	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	70g/L	ND	ND	0,170 ± 0,30	0,76 ± 0,77	0,02 ± 0,03	1,45 ± 1,58	ND
28	50g/L	0,05 ± 0,00	0,09 ± 0,04	0,340 ± *	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,57 ± 0,10	0,22 ± 0,02
	70g/L	ND	0,03 ± 0,06	0,55 ± 0,60	0,52 ± 0,42	0,05 ± 0,08	0,45 ± 0,20	ND
35	50g/L	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	70g/L	ND	1,38 ± 0,54	0,09 ± 0,16	1,46 ± 1,95	ND	0,86 ± 0,45	1,17 ± 0,40
42	50/Lg	ND	ND	4,62 ± 0,13	ND	4,56 ± 0,20	ND	ND
	70g/L	ND	0,17 ± 0,30	1,18 ± 0,81	1,09 ± 0,86	0,18 ± 0,32	0,50 ± 0,57	2,57 ± 1,57

De um modo geral, verificou-se que o aumento da concentração de cinzas no meio de cultivo, de 50 g/L para 70 g/L, favoreceu o aumento na produção da atividade de LiP para a maioria das linhagens.

Os resultados da atividade de MnP determinada em caldo de cultivo das 7 linhagens pré-selecionadas estão mostrados nas Tabela 5.4. O perfil de produção da MnP mudou drasticamente com o aumento de 50g/L para 70g/L de cinzas no meio de cultura para todas as linhagens avaliadas. Altas atividades de MnP foram determinadas em meio contendo 70g/L de cinzas. O fungo *Pleurotus* sp CCB068 teve sua produção de MnP aumentada em praticamente 15 vezes quando o mesmo foi cultivado em meio contendo 70g/L de cinzas (28° dia de cultivo).

A adição de 70 g/L também favoreceu a produção de MnP para os fungos *Pleurotus tailandia*, *Pleurotus sajor – caju* e *Agaricus campestris*. Para os fungos *Pleurotus* sp PSC94/03, *Pleurotus sajor-caju* e *Phanerochaete chrysosporium*, o aumento na concentração de cinzas no meio de cultivo, conseqüentemente, o aumento da concentração de PCDD/Fs e demais compostos presentes na cinza (metais pesados), não favoreceram uma maior produção de MnP em todos os dias.

O fungo *Pleurotus* sp PSC94/03 produziu MnP em concentrações superiores aos obtidos com 70 g/L quando o mesmo foi cultivado em 50g/L em todos os dias avaliados, exceção para o 7° dia de cultivo. Já os fungos *Pleurotus sajor- caju* e *Phanerochaete chrysosporium* somente não produziram MnP em quantidades superiores as quantidades detectadas em meio contendo 50g/L após 7 e 35 dias da adição de 70g/L de cinzas. Para os demais fungos foram observados comportamentos semelhantes aos obtidos com o fungo *Pleurotus* sp. CCB068. Novamente, a maior atividade determinada desta enzima foi após 3 dias de cultivo do fungo *Pleurotus* sp. CCB68 em meio contendo 50g/L de cinzas ($18,56 \pm 5,2$). Entretanto, deve-se ressaltar que a MnP foi detectada com maior frequência quando as linhagens foram cultivadas em meio contendo 70g/L de cinzas.

A enzima lacase também foi determinada durante 42 dias de cultivo das linhagens pré-selecionadas em meios contendo 50g/L e 70g/L de cinzas e os resultados obtidos desta quantificação estão descritos na Tabela 5.5. Quando o *Pleurotus* sp. CCB068 foi cultivado em meio líquido contendo 70g/L de cinzas, este produziu as maiores atividades de lacase durante todo o período avaliado.

Tabela 5.4. Atividade de MnP (U/L) determinada durante 42 dias de cultivo das 7 linhagens em meio líquido contendo 50g/L e 70g/L de cinzas. . * = feito em duplicata, não foi calculado o desvio padrão, ND = não determinado

Tempo(dias)	Cinzas	Atividade de MnP (U/L) para as diferentes linhagens						
		068	PT	94/03	PSC	20MA	BPC	BAC
3	50g/L	18,56 ± *	ND	ND	ND	0,31 ± *	3,07 ± 2,72	5,34 ± 1,30
	70g/L	14,48 ± 4,70	0,64 ± 1,14	0,87 ± 1,46	ND	3,03 ± 5,26	2,39 ± 3,61	7,56 ± 2,52
7	50g/L	4,53 ± *	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	70g/L	10,73 ± 3,98	10,70 ± 0,58	6,67 ± 3,95	4,20 ± 2,98	5,83 ± 6,38	6,16 ± 5,55	9,04 ± 2,66
14	50g/L	ND	ND	4,51 ± 0,23	ND	ND	0,66 ± 0,78	ND
	70g/L	7,03 ± 2,65	3,02 ± 1,44	3,36 ± 2,20	3,26 ± 5,64	4,45 ± 1,53	6,40 ± 8,72	10,22 ± 9,42
21	50g/L	4,60 ± 1,99	12,44 ± 6,70	10,55 ± 9,74	7,17 ± 2,64	2,06 ± 0,73	6,91 ± 1,56	11,87 ± 7,50
	70g/L	5,40 ± 4,97	7,89 ± 4,70	1,21 ± 2,10	2,08 ± 3,60	3,99 ± 3,03	3,60 ± 1,74	0,28 ± 0,32
28	50g/L	0,30 ± 0,26	ND	0,76 ± *	2,11 ± *	3,09 ± 0,11	ND	0,54 ± 0,27
	70g/L	14,89 ± 0,27	10,24 ± 0,97	ND	1,12 ± 1,94	14,90 ± 3,70	0,40 ± 0,70	2,63 ± 4,40
35	50g/L	ND	ND	2,60 ± 2,60	ND	ND	1,48 ± *	0,49 ± *
	70g/L	0,96 ± 1,04	3,20 ± 3,51	3,32 ± 3,55	1,53 ± 1,35	2,03 ± 1,32	1,81 ± 0,92	1,26 ± 1,95
42	50/Lg	3,23 ± 5,59	3,05 ± 5,28	13,69 ± 11,82	10,70 ± 4,16	8,64 ± 1,82	9,56 ± 3,01	ND
	70g/L	5,75 ± 1,32	0,42 ± 0,73	0,96 1,66	0,75 ± 0,65	1,61 ± 2,49	0,05 ± 0,08	1,02 ± 1,01

A atividade máxima de lacase produzida por esse fungo foi obtida após 7 dias de cultivo (17,4 U/L). Os resultados mostraram que o aumento na quantidade de cinza adicionada no meio de 50 g/L para 70 g/L apresentou um efeito positivo na produção de lacase para o *Pleurotus* sp CCB068, que pode ter auxiliado na transformação dos compostos tóxicos presentes no meio.

As demais linhagens fúngicas também produziram lacase durante o cultivo em meio contendo 70g/L de cinza, porém os valores obtidos da determinação de lacase foram muito inferiores quando comparados à produção do *Pleurotus* sp CCB068. Os fungos *Pleurotus tailandia*, *Agaricus campestris*, *Pleurotus sajor-caju* e *Pleurotus* sp PSC 94/03 produziram lacase somente a partir do 28º dia de cultivo.. *Pleurotus sajor-caju* 020 produziu lacase após 4 (0,5U/L); 14 (2,5 U/L) e 21 (0,1 U/L) dias de cultivo. E *P. chrysosporium* produziu essa enzima durante o 7º (0,1 U/L); 28º (0,2 U/L) e 42º (0,4 U/L) dia de cultivo. Os valores obtidos foram as maiores atividades de lacase determinadas por nosso grupo de pesquisa em experimentos de degradação nos quais utilizaram diversos compostos recalcitrantes como HAPs, herbicidas plásticos, e também diferentes linhagens fúngicas. Esse fato sugere que com o aumento da cinza no meio, conseqüentemente houve aumento na concentração de compostos tóxicos como PCDD/Fs e ainda os metais pesados (cádmio, chumbo) que levaram os microrganismos a sintetizarem maiores quantidades de enzimas. Essas enzimas podem estar envolvidas em processos de degradação das PCDD/Fs no meio. Muitos pesquisadores têm relacionado a presença de enzimas ligninolíticas com a degradação muitos compostos xenobióticos.

KEUM e LI (2004) avaliaram o tratamento de hidroxi PCBs (metabólitos tóxicos dos PCB's) com até 6 cloros substituídos utilizando lacase de 2 fungos (*Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*). Os resultados demonstraram que a lacase de *T. versicolor* degradou rapidamente esses compostos. As espécies dos fungos de decomposição branca produzem diferentes enzimas dependendo de sua genética e das condições de cultivo. As enzimas ligninolíticas chaves para a degradação incluem LiP, MnP e lacase.

MORI e KONDO (2002) estudaram a degradação de 2 compostos aromáticos clorados (2,7-DCDD e 2,8-DCDF) por *Phlebia lindtner*. O fungo de degradação branca produziu enzimas MnP e lacase e não produziu LiP. Os resultados mostraram que esse fungo metabolizou 2,7-CDD e 2,8 – CDF a hidroxi-DCDD e hidroxi- DCDF, respectivamente.

Tabela 5.5. Atividade de Lacase (U/L) determinada durante 42 dias de cultivo das 7 linhagens em meio líquido contendo 50g/L e 70g/L de cinzas. * = feito em duplicata, não foi calculado o desvio padrão, ND = não determinado

Atividade de lacase (U/L) para as diferentes linhagens								
Tempo(dias)	Cinzas	068	PT	94/03	PSC	20MA	BPC	BAC
3	50g/L	1,50 ± 0,01	0,014 ± *	ND	0,06 ± 0,04	ND	ND	0,04 ± 0,00
	70g/L	1,72 ± 1,62	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	50g/L	0,91 ± *	ND	ND	0,02 ± 0,02	ND	0,01± 0,01	ND
	70g/L	17,38 ± 4,92	ND	ND	ND	ND	0,06 ± 0,10	ND
14	50g/L	1,44 ± 0,13	0,04 ± 0,04	ND	0,11 ± 0,10	ND	ND	0,03 ± 0,06
	70g/L	6,50 ± 20,70	ND	0,65 ± 0,80	0,18 ± 0,31	2,48 ± 4,24	ND	ND
21	50g/L	1,41 ± 0,28	ND	ND	0,08 ± 0,10	ND	0,06 ± 0,02	0,08 ± 0,07
	70g/L	2,25 ± 0,17	ND	ND	ND	ND	ND	ND
28	50g/L	1,41 ± 0,28	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	70g/L	1,70 ± 0,18	0,03 ± 0,06	1,57 ± 2,14	0,21 ± 0,05	0,10 ± 0,18	0,18 ± 0,20	0,27 ± 0,14
35	50g/L	0,74 ± 0,23	ND	ND	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± *
	70g/L	ND	0,10 ± 0,17	ND	0,01 ± 0,01	ND	ND	0,03 ± 0,06
42	50/Lg	2,05 ± 0,39	0,25 ± 0,07	0,27 ± 0,16	0,14 ± 0,05	0,39 ± 0,07	0,24 ± 0,14	0,31 ± 0,15
	70g/L	2,19 ± 0,93	ND	0,35 ± 0,29	0,35 ± 0,27	ND	0,38 ± 0,16	0,03 ± 0,03

Estudos realizados por VALLI; WARIISHI e GOLD (1992), usando como composto modelo o 2,7-diclorodibenzo-*p*-dioxina (2,7-DCDD), o qual é significativamente menos tóxico do que 2,3,7,8-TCDD, mostraram claramente a eliminação de um cloro da molécula e a formação concomitante do 4-clorocatecol que foi dehalogendo posteriormente. Os dimetil éteres formados como intermediários do 4-clorocatecol foram desmetilados pela lignina peroxidase (LiP) ou manganês peroxidase (MnP) do *P. chrysosporium*.

Comparando-se os resultados da produção de enzimas ligninolíticas em meio de cultivo contendo 50g/L e 70g/L de cinza, verifica-se que a produção das enzimas lininolíticas LiP, MnP e lacase tende a mudar com o aumento na concentração da cinza no meio de cultivo. O efeito ocasionado na produção de enzimas pela adição de 70 g/L de cinzas foi mais pronunciado para a enzima MnP. Os fungos *Agaricus campestris* e *Pleurotus tailandia* apresentaram as maiores atividades de LiP e MnP somente quando cultivados em meio contendo 70 g/L. Para as demais linhagens fúngicas verificou-se que o aumento na produção e expressão das enzimas foi menor.

Verificou-se aumento na produção de lacase por *Pleurotus* sp CCB068 de praticamente 10 vezes quando o mesmo foi cultivado em meio contendo 70 g/L. *Pleurotus* sp. CCB068 produziu as maiores atividades de MnP e lacase, porém a LiP apresentou a menor atividade

O período no qual observou-se a maior produção de enzimas por *Pleurotus* sp. CCB068 foi durante as duas primeiras semanas de cultivo contendo cinzas (50 g/L e 70 g/L). Já para as demais linhagens após 35 dias de cultivo em meio contendo diferentes concentrações de cinzas foi verificado o aumento da atividade das enzimas avaliadas.

O potencial para degradação da lignina e compostos xenobióticos destas enzimas está bem documentado (MORI e KONDO, 2002) e é possível que as enzimas produzidas pelos fungos crescidos no meio contendo cinzas contaminadas com PCDD/Fs, possam estar agindo nesses compostos para que os microrganismos utilizem os mesmos como substrato de crescimento e também reduzindo a toxicidade do meio para favorecer a sobrevivência dos mesmos.

5.3.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

5.3.2.1 Sensibilidade das sementes

Diferentes espécies de plantas foram avaliadas com o objetivo de se obter uma ou mais espécies com elevada sensibilidade aos compostos tóxicos presentes nas cinzas (PCDD/Fs). Os resultados apresentados demonstraram que as plantas apresentaram diferentes respostas na presença de compostos tóxicos. Conforme pode ser observado na Tabela 5.6, as sementes de ervilha e cenoura não germinaram em presença do sobrenadante contendo PCDD/Fs e nem na água, provavelmente devido a um problema no lote dessas sementes, por isso foram descartadas. Os maiores comprimentos de radícula foram obtidos com sementes de pepino. O comprimento médio das radículas de sementes do controle, ou seja, tratadas somente com água foi de aproximadamente 1,70 cm e o comprimento médio da radícula obtido das sementes tratadas com o sobrenadante do controle abiótico apresentou aproximadamente 1,00 cm. O efeito fitotóxico ou seja da amostra para sementes em questão correspondeu a 42% .

Tabela 5.6. Comprimento das radículas de sementes (cm) medido após 42 horas (cm)

Sementes	Controle abiótico	Água	Efeito fitotóxico(%)
Ervilha	0,00	0,00	0,00
Cenoura	0,00	0,00	0,00
Rabanete	0,40	0,73	45,21
Pepino	0,98	1,69	42,13
Alface	0,14	0,47	70,58

O comprimento médio da radícula de sementes de alface tratadas com sobrenadante do controle abiótico apresentou 0,14 cm. Já o comprimento médio da radícula das sementes de alface germinadas somente com água destilada foi de 0,47 cm. O comprimento médio da radícula das amostras tratadas representou somente 30% do comprimento médio da radícula das sementes germinadas somente em água. Esses resultados mostraram que as sementes de alface apresentaram uma alta sensibilidade aos compostos presentes no sobrenadante do controle abiótico, sendo o efeito fitotóxico ocasionado pela amostra de, aproximadamente, 71% para essa semente. O comprimento médio da radícula das sementes de rabanete germinadas em água foi 0,73cm, já o comprimento médio da radícula de sementes tratadas com o sobrenadante foi 0,40 cm. O comprimento médio do tratamento representou aproximadamente 54,79% do comprimento médio do controle (água destilada) e o efeito fitotóxico de 45,21%.

Segundo FRIES (1995), existem grandes diferenças no consumo de dioxinas entre as espécies de plantas, portanto, é necessária a avaliação de diferentes sementes de plantas para determinar o grau de sensibilidade das sementes antes de iniciar o teste de toxicidade. Compostos de baixa solubilidade, como dioxinas e furanos, são absorvidos pelas raízes e translocados para as partes aéreas (FRIES, 1995). FACCHETTI et al. (1986) estudaram o crescimento de plantas em solos tratados com 2,3,7,8- TCDD (1-752 ng TCDD/ kg). Ao final do cultivo, amostras das raízes foram coletadas cuidadosamente, lavadas e analisadas. Os níveis de TCDD nas raízes foram maiores que os níveis encontrados no solo no qual as plantas foram crescidas.

Os resultados obtidos no teste de sensibilidade mostraram que a semente de alface apresentou maior sensibilidade aos compostos presentes no sobrenadante (controle abiótico contendo 70g/L de cinzas) e portanto foi escolhida para ser empregada nos testes de toxicidade posteriores.

5.3.2.2 Dose – resposta utilizando sementes de alface

Na figura 5.6 são mostrados os resultados do efeito fitotóxico obtido após tratamento de sementes de alface (*Lactuca sativa*) com diferentes concentrações de dibenzofurano.

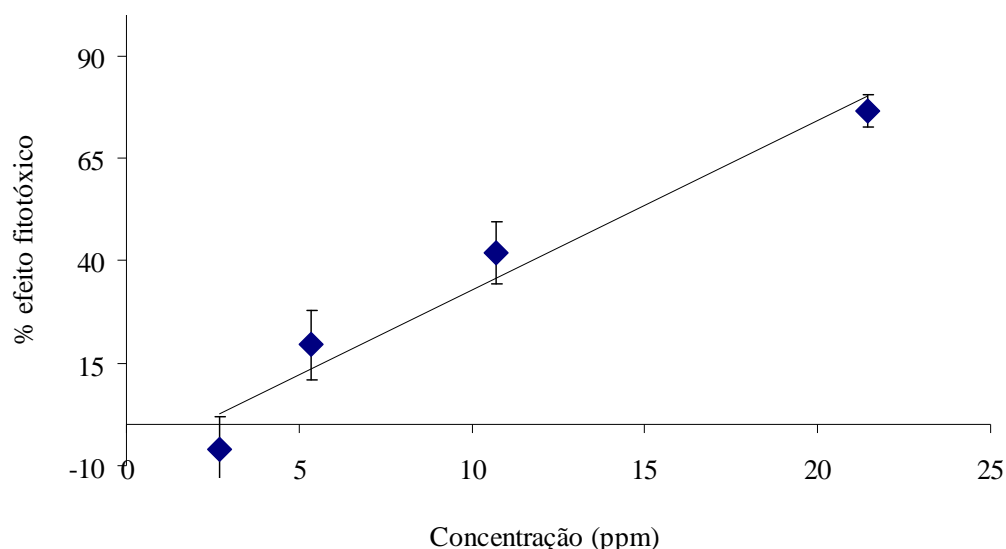


Figura 5.6. Dose – resposta obtida para sementes de alface (*Lactuca sativa*) semeadas em diferentes concentrações de dibenzofurano.

Os resultados apresentados são a média aritmética de triplicatas realizadas para cada concentração avaliada. São apresentados também os desvios padrões calculados para cada valor

médio. É possível observar na Figura acima que as sementes de alface apresentaram uma boa sensibilidade às diferentes concentrações de dibenzofurano. Verifica-se ainda uma relação entre o efeito fitotóxico e concentração de dibenzofurano, sendo que o efeito fitotóxico aumenta linearmente com o aumento da concentração do composto. A menor concentração avaliada (2,68 ppm) promoveu aumento no comprimento médio da radícula em relação ao comprimento médio obtido na radícula do controle e por isso o efeito fitotóxico apresentou valor negativo. Os maiores desvios foram obtidos com as menores concentrações.

Ao se ajustar os pontos a um modelo matemático, obteve-se melhores coeficientes de correlação com um modelo linear. A equação obtida para o dibenzofurano foi $y = 4,1376 x - 8,6378$, onde y = o efeito fitotóxico e x = concentração do composto, ($R^2 = 0,96$). A partir dessa equação foi possível calcular a concentração equivalente à redução de 50% do comprimento da radícula das plântulas (LC50) para o dibenzofurano ($\pm 14,17$ ppm).

Os resultados do efeito fitotóxico obtido com sementes de alface tratadas com diferentes diluições do sobrenadante do controle abiótico são mostrados na Figura 5.7.

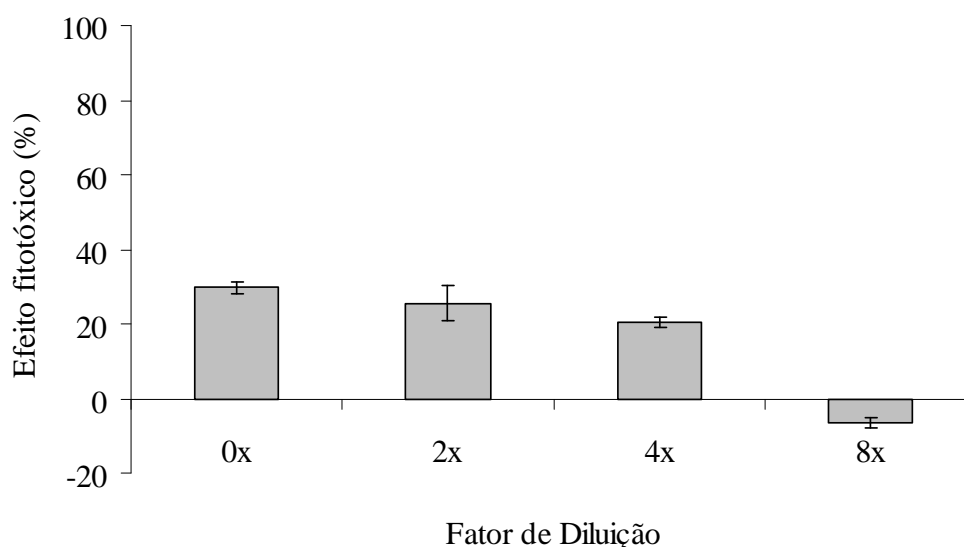


Figura 5.7. Efeito fitotóxico em sementes de alface obtido com diferentes diluições do sobrenadante do controle abiótico contendo 70 g/L de cinzas.

Verifica-se nessa Figura que o efeito fitotóxico apresentou pouca variação em relação às diluições realizadas; porém, quando a amostra foi diluída 8 vezes foi possível verificar que não houve efeito fitotóxico (-6,49 %), ao contrário houve estímulo no crescimento da radícula, ou

seja, o comprimento médio da radícula foi maior que o comprimento da radícula do controle. Esse comportamento também foi verificado na curva de dose – resposta utilizando a menor concentração do dibenzofurano (2,68 ppm). Observa-se ainda que os desvios padrões foram baixos, demonstrando que esse teste apresentou boa repetibilidade. Apesar do efeito fitotóxico não ter sido tão evidente entre uma diluição e outra, ainda assim foi possível verificar uma relação entre diminuição do efeito fitotóxico com a diminuição da concentração dos compostos no meio. A relação dose - resposta obtida com o sobrenadante não foi tão marcante quanto a relação apresentada no teste dose - resposta utilizando somente um composto, o dibenzofurano, (Figura 5.6), esse fato se deve a presença da mistura complexa de compostos no sobrenadante que apresentam diferentes características físicas, químicas e toxicológicas que influenciaram na resposta final das plantas.

5.3.2.3 Avaliação da toxicidade das amostras tratadas com os fungos pré-selecionados

Os efeitos fitotóxicos médios, e seus respectivos desvios padrão, produzidos pelas amostras de cinzas tratadas com as 7 linhagens pré-selecionadas são apresentados na Tabela 5.7.

As cinzas coletadas dos controles abióticos apresentaram o maior efeito fitotóxico durante todo o experimento (cerca de 75%), o que demonstra a grande toxicidade dos compostos existentes nas cinzas. A toxicidade apresentada pelas amostras dos sobrenadantes do controle abiótico ficou em torno de 65%.

Avaliando-se os resultados obtidos para o fungo *Pleurotus* sp. CCB068 verifica-se que a toxicidade da fase aquosa do meio de cultivo (sobrenadante) no qual o fungo cresceu foi menor do que a toxicidade apresentada pelo sobrenadante do controle abiótico, em todo o período avaliado. O que sugere que esse fungo utilizou os compostos presentes no meio transformando-os em metabólitos menos tóxicos do que os compostos presentes na cinza.

Quando os resultados da toxicidade da cinza coletada durante o crescimento do fungo são confrontados com o efeito fitotóxico apresentado na cinza sem tratamento (controle abiótico), verifica-se que o fungo reduziu a toxicidade do resíduo (cinza); esse fato demonstra que o mesmo estaria utilizando os compostos presentes no meio de cultivo como fonte de carbono e energia. Considerando ainda que a diminuição da toxicidade está diretamente relacionada ao processo de degradação, conforme postulada por MORI e KONDO (2000), o microrganismo estaria então diminuindo a concentração dos compostos presentes na cinza pela degradação dos mesmos, o que produz diminuição na toxicidade do meio.

No 14º dia observa-se um aumento na toxicidade do sobrenadante tratado com *Pleurotus* sp. CCB 068 e uma diminuição da toxicidade da cinza tratada com o mesmo fungo. Esse comportamento pode ser explicado pela liberação de compostos presentes nas cinzas através da ação do fungo e conseqüentemente um aumento na concentração dos mesmos na fase aquosa (sobrenadante). Entretanto, a partir do 14º dia verifica-se que o sobrenadante teve novamente sua toxicidade diminuída, sugerindo a utilização desses compostos pelo fungo *Pleurotus* sp CCB 068.

Observa-se ainda que, de um modo geral, os desvios apresentados pelas replicatas foram relativamente baixos, demonstrando que esse ensaio apresentou uma boa repetibilidade.

As amostras da fase aquosa (sobrenadante) tratadas com *P. tailandia* apresentaram efeito fitotóxico superior ao obtido com os sobrenadantes do controle abiótico. Esses resultados indicam que o *P. tailandia* promoveu um aumento na toxicidade pelo acúmulo de metabólitos tóxicos no meio de cultivo.

As cinzas tratadas com *P. tailandia* também apresentaram alta toxicidade (cerca de 80%) durante todo o período avaliado. Os resultados do efeito fitotóxico médio obtido nas amostras tratadas com *P. tailandia* (sobrenadante e cinza) mostraram que o mesmo não foi eficiente na diminuição do efeito fitotóxico, sugerindo que as atividades metabólicas desse fungo geraram metabólitos mais tóxicos que os compostos contidos nas cinzas.

O efeito fitotóxico produzido pela linhagem *Pleurotus* sp. PSC94/03, crescida em meio líquido contendo PCDD/Fs, como fonte principal de carbono e energia, também é mostrado na Tabela 5.7. É possível constatar a ocorrência de aumento gradual da toxicidade no sobrenadante durante o crescimento dessa linhagem. Porém até a primeira semana do estudo verificou-se que a toxicidade do sobrenadante do controle abiótico foi superior a apresentada pelo sobrenadante obtido do meio de cultivo de *Pleurotus* sp. PSC94/03. A partir do 14º dia de cultivo verificou-se maior toxicidade nas amostras de sobrenadante tratadas com *Pleurotus* sp. PSC 94/03 em relação ao controle abiótico, sugerindo o acúmulo de metabólitos tóxico no meio.

As amostras dos sedimentos coletadas do meio de cultivo do *Pleurotus* sp 94/03 durante 21 dias apresentaram uma elevada toxicidade quando comparada as amostras de sedimento sem tratamento

Tabela 5.7. Efeito fitotóxico médio determinado para amostras tratadas com as linhagens pré-selecionadas e amostras sem tratamento (controle abiótico).

Tratamento	Efeito fitotóxico médio (%) determinado em diferentes períodos				
	Tipo de amostra	3 (dias)	7 (dias)	14 (dias)	21 (dias)
Controle abiótico	Sedimento	57,46 ± 38,46	80,77 ± 13,41	56,31 ± 14,11	76,40 ± 11,11
	Sobrenadante	60,17 ± 11,98	65,23 ± 30,28	57,22 ± 6,69	65,16 ± 30,68
<i>Pleurotus</i> sp. CCB068	Sedimento	65,76 ± 14,50	64,69 ± 7,10	47,73 ± 7,37	71,41 ± 21,29
	Sobrenadante	27,46 ± 5,73	30,17 ± 23,72	62,98 ± 20,10	55,46 ± 15,90
<i>Pleurotus tailândia</i>	Sedimento	89,31 ± 11,02	81,97 ± 4,72	72,75 ± 23,60	80,92 ± 13,84
	Sobrenadante	71,28 ± 16,16	59,33 ± 17,61	76,52 ± 3,69	75,89 ± 17,84
<i>Pleurotus</i> sp. PSC 94/03	Sedimento	91,91 ± 7,01	96,66 ± 5,79	94,22 ± 2,04	82,44 ± 11,19
	Sobrenadante	53,18 ± 6,31	64,10 ± 11,99	84,07 ± 13,24	79,45 ± 20,41
<i>Pleurotus sajor –caju</i>	Sedimento	89,61 ± 1,53	66,31 ± 10,57	88,08 ± 7,18	72,76 ± 13,17
	Sobrenadante	57,80 ± 2,96	58,42 ± 19,55	56,00 ± 16,88	80,65 ± 6,86
<i>Pleurotus sajor caju</i> 020	Sedimento	74,74 ± 21,81	80,44 ± 8,83	87,27 ± 1,83	82,15 ± 9,40
	Sobrenadante	40,74 ± 30,82	56,51 ± 11,71	76,69 ± 2,06	86,90 ± 4,94
<i>Agaricus campestris</i>	Sedimento	82,26 ± 5,67	84,14 ± 9,84	28,14 ± 14,91	46,06 ± 8,23
	Sobrenadante	68,99 ± 9,26	47,67 ± 7,72	56,27 ± 6,23	68,82 ± 2,34
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Sedimento	100,00 ± 0,00	98,20 ± 2,48	96,53 ± 5,01	98,72 ± 2,23
	Sobrenadante	69,81 ± 4,33	78,23 ± 21,73	71,61 ± 34,59	69,04 ± 9,64

A toxicidade apresentada pela fase aquosa (sobrenadante) das amostras tratadas com *Pleurotus sajor-caju* permaneceu aproximadamente constante até o 14º dia de cultivo e após essa data houve um aumento na toxicidade das amostras. A toxicidade das amostras de cinzas variou durante o experimento não houve redução da toxicidade das cinzas tratadas em relação às amostras sem tratamento, exceção para o 7º dia de cultivo.

Observando os resultados obtidos para o fungo *Pleurotus sajor-caju* 020 é possível verificar que houve aumento gradual na toxicidade do meio (sobrenadante) em relação ao seu controle abiótico durante 21 dias de monitoramento do crescimento desta linhagem. Esse comportamento também foi observado nas amostras de cinzas tratadas.

O aumento crescente na toxicidade pode ser devido à atividade microbiana e possivelmente ao acúmulo dos produtos do metabolismo das enzimas produzidas por este fungo.

Avaliando-se os resultados obtidos para o efeito fitotóxico para amostras de cinzas tratadas com *Agaricus campestris* verificou-se que a toxicidade das amostras dos sobrenadantes tratadas por esta linhagem variou durante todo o período avaliado.

Após 7 dias de cultivo do *Agaricus campestris* foi possível verificar que o mesmo possibilitou diminuição da toxicidade do meio de cultivo, possivelmente pela utilização dos compostos do meio como fonte de carbono e energia, sendo os seus produtos metabólicos menos tóxicos que os compostos originalmente presentes na cinza. A partir do 14º dia de cultivo do fungo, ocorreu aumento na toxicidade do sobrenadante. Com relação à toxicidade apresentada pela cinza tratada com *Agaricus campestris*, verificou-se que a mesma permaneceu constante e superior, em relação ao controle abiótico, durante a primeira semana de cultivo deste fungo, e a partir do 14º dia de cultivo houve redução drástica da toxicidade, chegando a praticamente metade da toxicidade apresentada pela cinza do controle abiótico. Essa diminuição da toxicidade da cinza coincide com a ocorrência de pequeno aumento da toxicidade do sobrenadante, possivelmente pela liberação desses compostos para o meio e a utilização pelo fungo desses compostos. Esses resultados sugerem que o *Agaricus campestris* foi capaz de utilizar os compostos presentes na cinza, sendo os seus metabólitos menos tóxicos que os compostos originalmente presentes na cinza.

Os sobrenadantes coletados do meio de cultivo do *Phanerochaete chrysosporium* apresentaram toxicidade muito superior à toxicidade verificada nos sobrenadantes das amostras sem tratamento (controle abiótico), durante o período avaliado.

As cinzas tratadas com *Phanerochaete chrysosporium* apresentaram 100% de efeito fitotóxico, ou seja, não houve germinação das sementes nas amostras das cinzas tratadas por esse fungo. Esses resultados demonstram que o *Phanerochaete chrysosporium* não foi capaz de transformar os compostos presentes no meio em compostos menos tóxicos. Ocorreu uma potencialização da toxicidade do meio pela ação do fungo, demonstrando que o mesmo não deve ser utilizado para biorremediar misturas presentes em cinzas.

5.3.3 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE

Com o objetivo de avaliar melhor a utilização dos compostos presentes nas cinzas pelos fungos, determinou-se também a produção de biossurfactante, utilizando-se tensiômetro, e os resultados obtidos das médias dos valores de tensão superficial de 3 replicatas são apresentados na Tabela 5.8

Tabela 5.8. Tensão superficial (mN/m) determinada nas amostras dos sobrenadantes coletados após 3, 7, 14 e 21 dias de cultivo das 7 linhagens pré-selecionadas

Tratamento	Tensão superficial (mN/m) dos sobrenadantes			
	3 dias	7 dias	14 dias	21 dias
Controle Abiótico	63,07 ± 8,89	60,80 ± 7,67	68,50 ± 0,85	66,43 ± 2,20
<i>Pleurotus</i> sp CCB 068	52,60 ± 3,90	57,30 ± 1,95	58,87 ± 1,46	59,63 ± 1,91
<i>Pleurotus</i> <i>tailandia</i>	60,13 ± 5,79	56,53 ± 0,38	58,57 ± 1,67	57,73 ± 5,46
<i>Pleurotus</i> sp PSC 94/03	62,10 ± 9,57	59,80 ± 0,48	55,20 ± 5,52	63,30 ± 2,60
<i>Pleurotus</i> <i>sajor caju</i>	63,70 ± 1,13	60,43 ± 1,85	50,13 ± 1,69	58,37 ± 1,11
<i>Pleurotus</i> <i>sajor caju</i> 020	62,13 ± 2,73	61,50 ± 5,58	64,67 ± 0,49	52,30 ± 4,67
<i>Agaricus</i> <i>campestris</i>	54,70 ± 3,68	62,70 ± 1,67	58,03 ± 1,78	50,97 ± 9,69
<i>Phanerochaete</i> <i>chrysosporium</i>	57,30 ± 10,87	54,25 ± 8,84	65,20 ± 4,33	64,60 ± 1,81

A produção de moléculas com atividade de redução da tensão superficial ocorre quando os substratos fornecidos aos microrganismos são hidrocarbonetos, possibilitando aos microrganismos utilizarem estes compostos, normalmente insolúveis em meio aquoso, o que

impede a sua oxidação e assimilação (COLLA e COSTA, 2003). Há uma grande quantidade de microrganismos com capacidade para degradar e/ou assimilar compostos recalcitrantes (ex. HAPs). Desse número de microrganismos, alguns também são capazes de emulsificar esses compostos durante o processo de degradação do substrato (COLLA e COSTA, 2003).

A tensão superficial apresentada pela água destilada é de 72 mN/m a 20° C e esse valor é usado como parâmetro para avaliação da diminuição da tensão superficial em muitos casos, porém nesse estudo, a diminuição da tensão superficial promovida pela ação dos fungos foi comparada aos valores de tensão superficial obtidos para amostras do controle abiótico em cada dia avaliado. Como pode ser verificada a tensão superficial do meio de cultivo sem o fungo foi menor que a tensão superficial apresentada pela água, devido à adição de sais minerais e pH (5,0) que alteraram a tensão superficial.. Conforme pode ser observado na Tabela 5.8, todos os fungos foram capazes de produzir biossurfactantes em pelo menos em um dia de avaliação. Após 3 dias de cultivo dos fungos *Pleurotus* sp.CCB 068, *Agaricus campestris* e *Phanerochaete chrysosporium*, em meio líquido contendo cinzas, foi verificado que a tensão superficial do meio foi diminuída de $63,07 \pm 8,89$ mN/m para $52,80 \pm 3,90$ mN/m; $54,70 \pm 3,68$ e $57,30 \pm 10,87$ mN/m; respectivamente. As demais linhagens promoveram pequenas reduções na tensão superficial quando comparados aos valores de tensão superficial obtidos para o controle abiótico no mesmo período. No 7° dia foi verificada diminuição da tensão superficial para todos as amostras avaliadas, exceção para *Agaricus campestris*. A maior redução da tensão superficial obtida após uma semana se cultivo em meio contendo cinzas foi verificada para os fungos *Phanerochaete chrysosporium* (aproximadamente 7 unidades); *Pleurotus tailandia* e *Pleurotus* sp. CCB 068 (aproximadamente 4 unidades). A partir do 14 ° foi verificado que todas as linhagens promoveram reduções na tensão superficial, sendo a linhagem *Pleurotus sajor –caju* responsável pela maior redução de tensão superficial (de $68,50 \pm 0,85$ mN/m para $50,13 \pm 1,69$ mN/m), seguida das linhagens *Pleurotus* sp. PSC 94/03; *Agaricus campestris*; *Pleurotus tailandia* e *Pleurotus* sp. CCB068.

Todas as linhagens avaliadas promoveram reduções na tensão superficial após 21 dias de cultivo em meio contendo 70 g/L de cinzas sendo que os fungos *Pleurotus sajor- caju* 20 e *Agaricus campestris* produziram as menores reduções de tensão superficial.

Quando os resultados obtidos da avaliação da toxicidade são confrontados com os resultados obtidos da determinação dos biossurfactantes, verifica-se que não houve relação entre

diminuição da toxicidade e redução da tensão superficial do meio (biossurfactante) para todas as linhagens avaliadas. O *Phanerochaete chrysosporium* não foi hábil para reduzir a toxicidade do meio de cultivo (sobrenadante e cinza) apesar de produzir biossurfactante. Já o *Pleurotus* sp.CCB 068 diminuiu a toxicidade do meio de cultivo (sobrenadante e cinzas) e também produziu biossurfactante durante todo o período estudado. O *Pleurotus tailandia* promoveu diminuição da tensão superficial durante todo o período avaliado, porém não reduziu a toxicidade das amostras (sobrenadante e cinzas). As amostras tratadas com o *Pleurotus sajor-caju* 020 apresentaram elevada toxicidade durante todo o período avaliado tendo ainda valores de tensão superficial semelhantes aos obtidos nas amostras sem tratamento (controle abiótico), exceção para o 21º dia de cultivo. O fungo *Pleurotus sajor-caju* produziu altas quantidades de biossurfactante e promoveu aumento da toxicidade nos sobrenadantes, o que sugere que fungo promoveu a liberação dos compostos presentes na cinza pela ação dos biossurfactantes, entretanto, não conseguiu transformar os compostos tóxicos em metabólitos menos tóxicos.

O *Agaricus campestris* promoveu as maiores reduções de tensão superficial após 14 e 21 dias de cultivo de $68,50 \pm 0,85$ mN/m para $58,03 \pm 1,78$ mN/m; e $66,43 \pm 2,20$ mN/m para $50,97 \pm 9,69$ mN/m, respectivamente. Durante esse período verificou-se que houve uma alta redução da toxicidade da cinza e pequeno aumento na toxicidade do sobrenadante coletado do meio de cultivo deste fungo. Esse fato sugere a transferência dos compostos tóxicos presentes na cinza para a fase aquosa (sobrenadante) e utilização dos mesmos pelo *Agaricus campestris*, o qual conseguiu produzir metabólitos com menor toxicidade do que os compostos originalmente presentes na cinza.

E finalmente, avaliando os resultados obtidos pelo fungo *Pleurotus* sp. PSC94/03 verificou-se que o mesmo promoveu as menores reduções de tensão superficial, exceção para o 14º dia de cultivo, e não foi hábil para diminuir a toxicidade do meio de cultivo (sobrenadante e cinza).

Os surfactantes desempenham um papel importante para a remediação *in situ* e também como medida auxiliar para estimular a biodegradação dos compostos xenobióticos. Eles permitem a solubilização dos compostos, aumentando a área de superfície e permitindo maior contato dos microrganismos com o substrato (COLLA e COSTA, 2003). Os surfactantes ajudam na degradação pela solubilização ou emulsificação, por liberarem os compostos adsorvidos na matéria orgânica do solo, sedimentos ou outras matrizes ambientais (cinzas) e aumentam as

concentrações dos compostos hidrofóbicos, resultando no aumento da transferência de massa (CAMEOTRA e BOLLAG, 2003).

HUANG; TAKAOKA e TAKEDA (2003) avaliaram a remoção de clorobenzenos presentes em cinzas de Incinerador Municipal utilizando surfactantes químicos. Os resultados mostraram que os surfactantes aumentaram a eficiência da remoção dos clorobenzenos nas cinzas. Sendo assim, é possível adicionar surfactantes nas cinzas para aumentar a biodisponibilidade dos contaminantes presentes na mesma (PCDD/Fs, PCBs entre outros), aumentando a eficiência na degradação desses compostos por microrganismos.

Entretanto, para que haja degradação das moléculas xenobióticas é necessário que o microrganismo produza enzimas necessárias para catalisar as reações responsáveis pela quebra das moléculas.

Em muitos casos a biorremediação é realizada pelo uso de microrganismos sem que haja produção de biosurfactantes. A biorremediação *in situ* tem sido utilizada em solos e sedimentos contaminados com PCBs, compostos muito semelhantes às dioxinas e furanos, através do uso de uma diversidade de fungos e bactérias. RUIZ-AGUILAR GRACIELA et al. (2001) utilizaram os fungos *P. chrysosporium*, *Trametes versicolor* e *Lentinus edodes* na biorremediação de uma mistura de PCBs (concentração inicial de 300- 6.000 mg/L), com adição de surfactante sintético (Tween 80). Os resultados mostraram que adição do surfactante melhorou a eficiência na degradação desses compostos.

Avaliando-se os resultados obtidos de produção de enzimas ligninolíticas, de biosurfactantes e a toxicidade durante o tratamento das 7 linhagens pré-selecionadas, verificou-se que a linhagem *Pleurotus* sp. CCB068 se destacou por produzir as maiores atividades das enzimas MnP e lacase. Essa linhagem ainda promoveu a diminuição da toxicidade de ambas frações (sobrenadante e cinza) durante o seu cultivo e também produziu biosurfactantes durante todo o período avaliado. As demais linhagens *Pleurotus tailandia*, *Agaricus campestris*, *Pleurotus sajor- caju*, *Pleurotus sajor- caju* 020, *Phanerochaete chrysosporium* e *Pleurotus* sp PSC94/03 apesar de promoverem reduções na tensão superficial, não foram hábeis para reduzir a toxicidade do meio de cultivo e produzir altas atividades das enzimas ligninolíticas e por isso não foram utilizadas para a continuação do trabalho. A velocidade de biodegradação depende de cada espécie de microrganismo, por isso as diferenças no metabolismo dos compostos pelas linhagens avaliadas já eram esperadas.

A capacidade biodegradativa da linhagem *Pleurotus* sp CCB068 tem sido avaliada para diferentes compostos xenobióticos e resultados recentes têm sido animadores. TOMAZ.; FRANCO e DURRANT (2004) reportaram a degradação de aproximadamente 61% do herbicida Staple 28CS em apenas 7 dias de cultivo do *Pleurotus* sp CCB068. Esses resultados reforçam ainda mais o potencial dessa linhagem para biodegradar compostos xenobióticos em matriz es ambientais .

Após a avaliação dos resultados de produção de enzimas, de biossurfactantes e de redução da toxicidade do meio contendo cinzas, foi demonstrado que o fungo *Pleurotus* sp CCB068 possui capacidade biodegradativa, por apresentar as ferramentas necessárias para a realização do tratamento de compostos xenobióticos, e portanto, essa linhagem foi selecionada para ser utilizada em experimentos de degradação utilizando composto modelo e PCDD/Fs. Os resultados apresentados a seguir somente foram obtidos com a linhagem *Pleurotus* sp. CCB068.

5.4 CRESCIMENTO DO *Pleurotus* sp CCB 068 EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PCDD/FS

A resposta do fungo *Pleurotus* sp CCB 068 mediante diferentes concentrações de PCDD/Fs foi avaliada através da determinação da produção de enzimas ligninolíticas e pela capacidade de redução da toxicidade do meio. Os resultados desse estudo estão descritos a seguir.

5.4.1 Produção de enzimas ligninolíticas

A importância de altos níveis extracelulares de enzimas ligninolíticas que permitam eficiente degradação de compostos recalcitrantes sob condições *in vivo* está relacionada à sorção e complexação das enzimas no solo, e provável perda de atividade quando as mesmas se encontram liberadas no meio ambiente (STOTZKY e BURNS, 1982).

Os resultados das determinações das enzimas lacase, lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) são mostrados na Figura 5.8.

A produção da enzima LiP, demonstrada na Figura 5.8.A, apresentou aumento com a adição de cinzas em concentrações superiores a 70 g/L. Quando o *Pleurotus* sp. CCB068 foi cultivado em meio contendo 70 g/L de cinzas produziu baixa atividade de LiP nas primeiras 2 semanas de estudo e após essa data, a LiP não foi mais detectada. Já em concentrações superiores a 70 g/L observou-se maior produção desta enzima por *Pleurotus* sp CCB068, exceto em meio

contendo 130 g/L sendo que as atividades de LiP alcançaram valores de atividade de 5,5 U/L, as maiores atividades dessa enzima determinadas durante toda a execução do projeto.

Na Figura 5.8B estão demonstrados os resultados obtidos da produção da enzima lacase pelo *Pleurotus* sp. CCB068 durante 42 dias em meios contendo diferentes concentrações de cinzas. É possível verificar claramente que acima de 70 g/L de cinzas a produção da enzima lacase teve grande queda, esse efeito foi mais evidente quando comparamos os resultados obtidos com 70g/L (17, 38 U/L/ 7º dia) e 90 g/L (1,53 U/L/ 7º dia). Verificou-se que quando o fungo foi cultivado em meio contendo cinzas acima de 90 g/L a produção da lacase não apresentou grandes variações sendo que as maiores atividades ficaram em torno de 3U/L.

Na Figura 5.8.C são mostrados os resultados das atividades de MnP determinadas durante o crescimento do *Pleurotus* sp CCB068 em diferentes quantidades de cinzas.

Observa-se novamente o mesmo comportamento obtido para a enzima lacase, ou seja, os maiores valores de atividade desta enzima foram obtidos em meios de cultivos contendo 70 g/L de cinzas. Somente quando o fungo foi crescido em 130 g/L de cinzas houve uma alta atividade de MnP após 14 dias de cultivo, porém após esse período houve diminuição da atividade em questão. As demais quantidades de cinzas não favoreceram aumento na atividade desta enzima.

Os resultados obtidos nas determinações enzimáticas sugerem que ao se adicionar concentrações superiores a 70 g/L cinzas ao meio, houve aumento da toxicidade devido ao aumento da concentração dos compostos tóxicos presentes nas cinzas como PCDD/Fs e metais pesados, levando a inibição do crescimento do fungo.

Diferentes compostos influenciam a estabilidade das enzimas ligninolíticas. Muitos trabalhos publicados atribuem as altas concentrações de metais pesados no ambiente como sendo um dos fatores limitantes para a aplicação dos processos de biorremediação. Existe uma ampla variedade de compostos que regulam a atividade das enzimas incluindo os substratos. Os metais pesados são também um importante grupo de moduladores da atividade enzimática, os quais estão presentes no ambiente naturalmente (Cu) ou como resultado da atividade humana (Cd, Hg, Pb) (BALDRIAN e GABRIEL, 2002). Dependendo da concentração desses metais pesados no meio, pode haver redução, aumento ou até inativação da enzima pelo microorganismo.

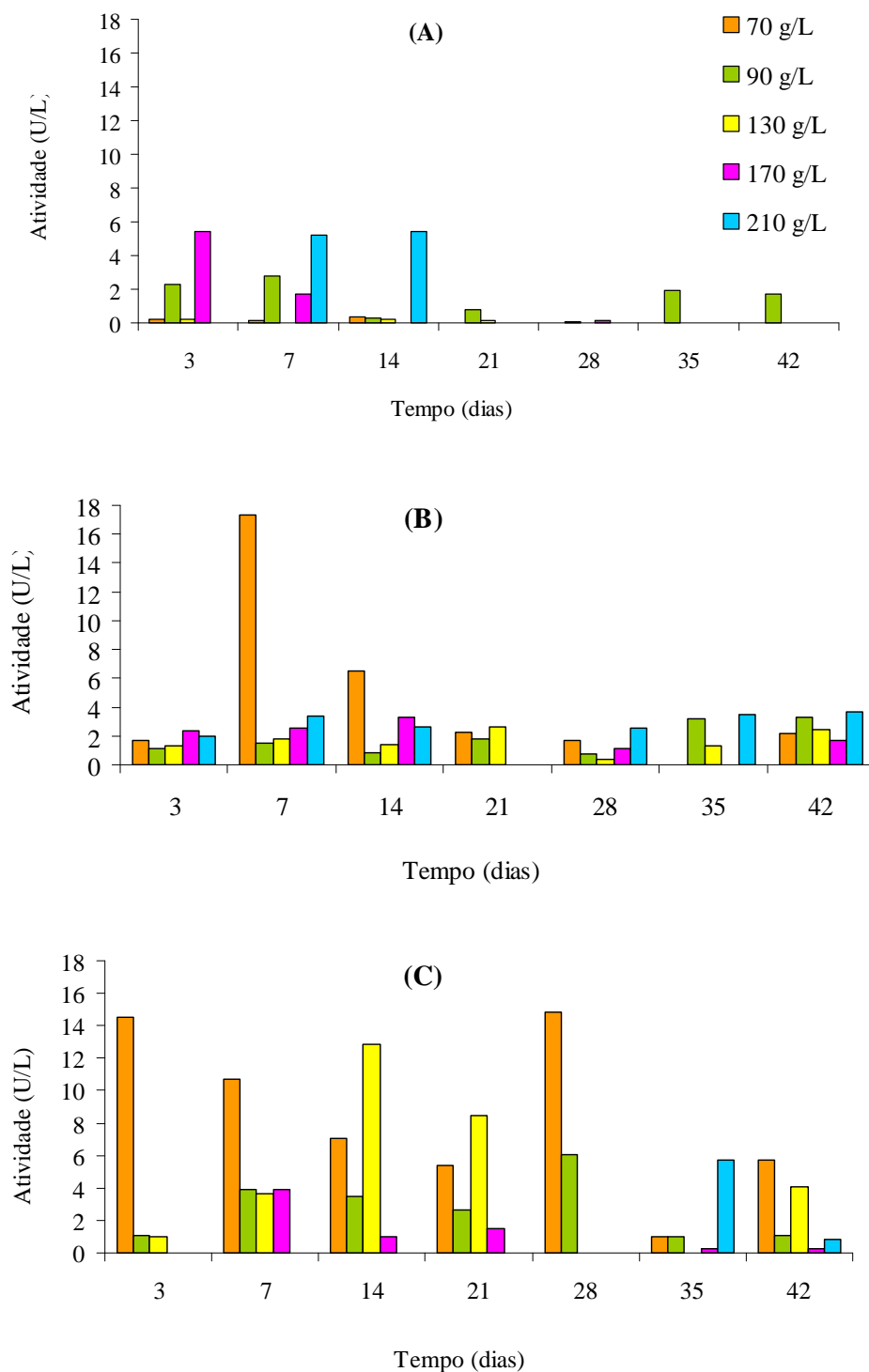


Figura 5.8. Enzimas ligninolíticas produzidas por *Pleurotus* sp 068 crescido em diferentes concentrações de cinzas (70g/L, 90 g/L, 130 g/L, 170 g/L e 210 g/L). (A) Produção da LiP e, (B) Produção da Lacase e (C) Produção da MnP. Os valores são médias aritméticas de 2 replicatas.

A indução de lacase por Cd tem sido bem documentada em *Pleurotus ostreatus* (BALDRIAN e GABRIEL, 2002). BALDRIAN et al (2000) verificaram que a degradação de HAPs por *Pleurotus ostreatus* em solo não estéril não foi afetada pela presença de cádmio no meio e, elevadas concentrações de lacase foram encontradas na presença de baixas concentrações deste metal (BALDRIAN et al, 2000).

Os metais pesados não influenciam somente a atividade de lacase; a atividade de MnP é muito sensível à presença de metais pesados e a inibição de sua atividade em solo suplementado com Cd provavelmente leva a degradação limitada de HAPs. Quando extratos de culturas fúngicas contendo MnP foram incubadas na presença de Cd, Cu e mercúrio (Hg), a atividade foi diminuída mesmo em baixas concentrações destes 3 metais pesados (BALDRIAN e GABRIEL, 2002).

5.4.2 Toxicidade do meio de cultivo

Os resultados obtidos dos bioensaios utilizando sementes de alface (*Lactuca sativa*) na avaliação da toxicidade durante tratamento com o fungo *Pleurotus* sp. CCB068 estão demonstrados nas Tabelas 5.9 e 5.10.

Verifica-se que não houve correlação entre aumento da quantidade de cinzas e aumento da eficiência da redução toxicidade promovida pelo fungo (Tabela 5.9). Quando a linhagem foi crescida em meio contendo 90 g/L e 130 g/L de cinzas observa-se aumento da toxicidade do meio tratado em relação ao seu controle abiótico durante o período avaliado, exceção para o 35° (44,40 %) e o 42° (45,83 %) dias de cultivo do fungo em meio contendo 130 g/L de cinzas.

Já quando o fungo foi crescido em 170 g/L e 210 g/L verifica-se redução da toxicidade do meio em virtude das atividades metabólicas do fungo. Considerando-se ainda que nessas amostras detectaram-se as maiores atividades da enzima LiP (Item 5.4.1, Figura 58B) é possível que a mesma esteja envolvida na redução da toxicidade do meio. Comparando-se esses resultados com os resultados obtidos da redução da toxicidade em meio contendo somente 70 g/L verifica-se que a maior redução da toxicidade foi obtida quando o fungo foi cultivado em meio líquido contendo 70 g/L de cinzas, e essa concentração favoreceu também alta produção de enzimas lacase e MnP por essa linhagem.

Tabela 5.9. Efeito fitotóxico (%) determinado para sobrenadantes coletados durante 42 dias de cultivo do *Pleurotus* sp CCB068 em meio líquido contendo diferentes quantidades de cinzas.

Tempo (dias)	90 g/L		130 g/L		170 g/L		210 g/L	
	Cont. ¹	Trat. ²	Cont. ¹	Trat. ²	Cont. ¹	Trat. ²	Cont. ¹	Trat. ²
3	65,39	76,89	52,14	45,00	68,00	77,02	85,09	71,67
7	66,93	71,11	55,83	64,40	67,27	45,95	66,18	80,95
14	79,78	85,66	49,88	63,21	78,91	47,86	77,45	72,38
21	76,24	72,07	55,36	58,57	79,64	70,00	90,91	74,52
28	83,41	71,70	67,02	73,33	58,91	47,86	81,09	76,19
35	73,03	75,60	72,14	44,40	92,36	68,57	80,00	57,38
42	76,40	74,85	61,79	45,83	91,82	60,24	80,36	42,62

1= controle abiótico, 2= amostras tratadas com o fungo *P. sp* CCB68

A porcentagem do efeito fitotóxico médio obtidos dos sedimentos (cinzas) são mostrados na Tabela 5.10.

Tabela 5.10. Efeito fitotóxico (%) determinado para cinzas (sedimento) coletadas durante 42 dias de cultivo do *Pleurotus* sp CCB068 em meio líquido contendo diferentes quantidades de cinzas

Tempo (dias)	Efeito fitotóxico (%) em diferentes quantidades de cinzas							
	90 g/L		130 g/L		170 g/L		210 g/L	
	Cont. ¹	Trat. ²	Cont. ¹	Trat. ²	Cont. ¹	Trat. ²	Cont. ¹	Trat. ²
3	41,57	85,02	91,90	98,93	82,14	92,02	90,48	97,62
7	79,99	82,56	87,02	99,40	100,00	88,10	100,00	100,00
14	31,94	71,38	96,79	95,83	100,00	88,10	99,52	98,81
21	42,22	69,68	94,46	98,10	100,00	98,10	71,67	100,00
28	26,59	90,58	94,11	98,10	80,48	100,00	100,00	96,19
35	29,77	80,42	87,50	94,52	69,52	100,00	100,00	97,62
42	38,52	79,08	100,00	95,12	76,19	60,12	100,00	100,00

1=, controle abiótico , 2= amostras tratadas com *P. sp* CCB68.

Os resultados da Tabela 5.10 indicam que o fungo não foi hábil para reduzir a toxicidade da cinza em amostras contendo concentrações superiores a 70 g/L, exceção para 170 g/L. Na maioria dos casos verifica-se ainda que a toxicidade do meio foi bem maior quando o fungo foi utilizado.

Tanto os resultados das atividades enzimáticas como os de toxicidade demonstraram que a melhor condição de cultivo para o fungo foi quando se utilizou 70 g/L de cinzas, como fonte carbono e energia.

5.5 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO DIBENZOFURANO

5.5.1 Microextração Em Fase Sólida (SPME)

A Figura 5.9 mostra a curva de equilíbrio de extração para o dibenzofurano. Essa curva se fez necessária para avaliação do melhor tempo de exposição da fibra para se obter uma boa extração. Observa-se que os tempos de extração de 1 a 5 min não atingiram o equilíbrio, e portanto, não são adequados para a extração. A partir de 10 min de exposição da fibra, a extração começa a entrar em equilíbrio, permanecendo relativamente constantes. Com base nos resultados obtidos pela curva de equilíbrio, optou-se pela extração por 10 min no “headspace” da amostra; pois foi considerado bom intervalo de tempo para a extração.

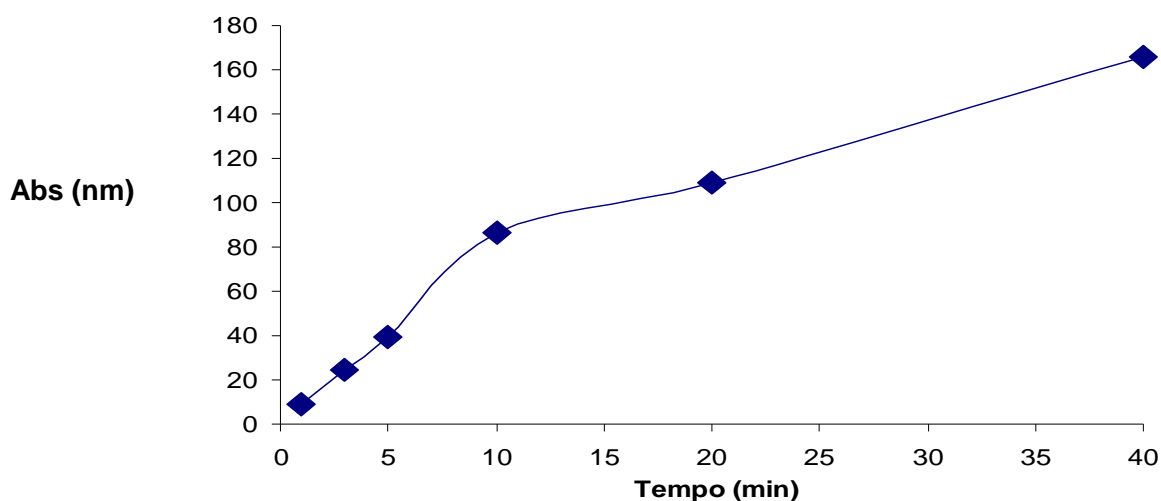


Figura 5.9. Curva de equilíbrio de extração em SPME do dibenzofurano

A técnica de SPME tem sido estudada como uma alternativa útil, simples, versátil e de baixo custo quando comparada às extrações clássicas como líquido- líquido e a extração em fase sólida de compostos voláteis nos resíduos industriais. Esta técnica evita problemas de contaminação ligados ao uso de solventes e manipulação das amostras e reduzem significativamente a quantidade de solventes na extração e o tempo de análise (SALAFRANCA et al., 2003). Muitos artigos têm sido publicados sobre a determinação de uma ampla variedade de compostos, inclusive dibenzofuranos e matrizes (água, refrigerante, etc), porém essa técnica ainda não havia sido utilizada para monitoramento de processos de biorremediação e biodegradação de compostos xenobióticos. Portanto, a mesma foi testada nesse projeto com o objetivo de verificar a viabilidade desta técnica para propostas de biorremediação, além de minimizar a produção de resíduos de extração em laboratório.

5.5.2 Crescimento do *Pleurotus* sp. 068 em meio contendo dibenzofurano

O dibenzofurano foi utilizado como composto modelo na avaliação da capacidade de degradação do *Pleurotus* sp CCB068 cultivado em meio líquido. Os resultados das determinações da porcentagem de degradação do dibenzofurano por *Pleurotus* sp 068 monitorado durante 28 dias estão mostrados na Figura 5.10.

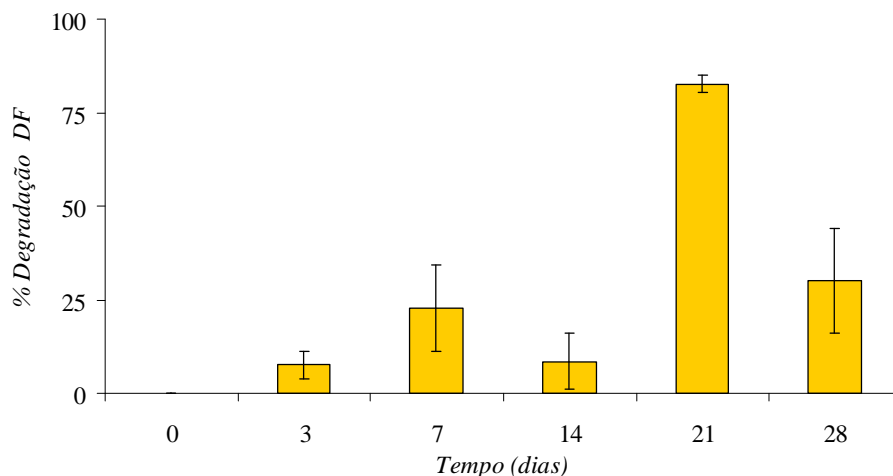


Figura 5.10. Degradação do dibenzofurano por *Pleurotus* sp 068 monitorado durante 28 dias de cultivo.

Nesse estudo utilizou-se concentração de aproximadamente 110 µg/L para garantir que todo o composto fosse solubilizado em 50 mL de meio, pois caso isso não ocorresse, a extração do composto utilizando a técnica de SPME não seria possível. Testes preliminares utilizando-se concentrações bem acima dos limites de solubilidade dos compostos mostraram que essa técnica de extração não foi adequada para a quantificação da degradação (dados não mostrados). Além disso, deve-se salientar que os limites encontrados para PCDD/Fs no meio ambiente estão à níveis de picogramas (pg) ou nanogramas(ng), portanto nesse estudo a concentração avaliada foi muito superior a concentração encontrada nas amostras ambientais.

Conforme pode ser observado na Figura 5.10, após 3 dias de cultivo do fungo em meio contendo dibenzofurano (DF), como única fonte de carbono e energia, foi determinado uma pequena porcentagem de redução do composto, sendo esse comportamento mantido durante as duas primeiras semanas do estudo. Após 21 dias de cultivo do *Pleurotus* sp. 068 houve redução do dibenzofurano de 74%, porém essa redução não foi verificada após 28 dias, onde somente uma menor porcentagem de degradação do composto ocorreu. Os resultados indicaram que a taxa de redução do dibenzofurano foi lenta. Esse fato está ligado à concentração muito baixa do mesmo em meio líquido, o que causou crescimento lento do fungo. Portanto, para avaliar a degradação de PCDD/Fs por essa linhagem, o tempo de cultivo teria que ser bem maior considerando as concentrações a traços dos compostos em questão e devido os mesmos apresentarem diferentes graus de solubilidade em água.

É importante salientar que a biodegradação de dibenzo-*p*-dioxinas (DD) e dibenzofuranos (DF) por bactérias tem sido extensivamente estudada (WITTICHI, 1998), e a degradação de DD e DF por fungos filamentosos e leveduras também tem sido reportada (HAMMER et al, 1998). Entretanto, o número de publicações sobre a biodegradação de DD e DF por fungos de decomposição branca não são numerosos (MORI e KONDO, 2002), sendo relevante estudos relacionados a este assunto. O DF é um composto xenobiótico que não é facilmente biodegradável (ROMERO et al, 2002) e o encontro de espécies de microrganismos com capacidade biodegradativa para esses compostos é de grande importância.

5.6. AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE PCDD/FS

Para avaliação da degradação dos PCDD/Fs por *Pleurotus* sp. CCB068, foram feitas somente duas amostragens para a realização de análise de cromatografia gasosa acoplada por espectrômetria de massa (CG/EM) de alta resolução e somente as cinzas (sedimento) foram

analisadas por essa técnica. Os resultados obtidos para os 17 compostos de dioxinas e furanos substituídos nas posições 2, 3, 7 e 8 são mostrados na Figura 5.11.

A concentração dos compostos foi verificada nas amostras tratadas por *Pleurotus* sp CCB068 e nas amostras controles e a degradação dos compostos no meio foi determinada pela redução das quantidades determinadas dos compostos nas amostras em relação à quantidade encontrada dos mesmos nas amostras do controle abiótico.

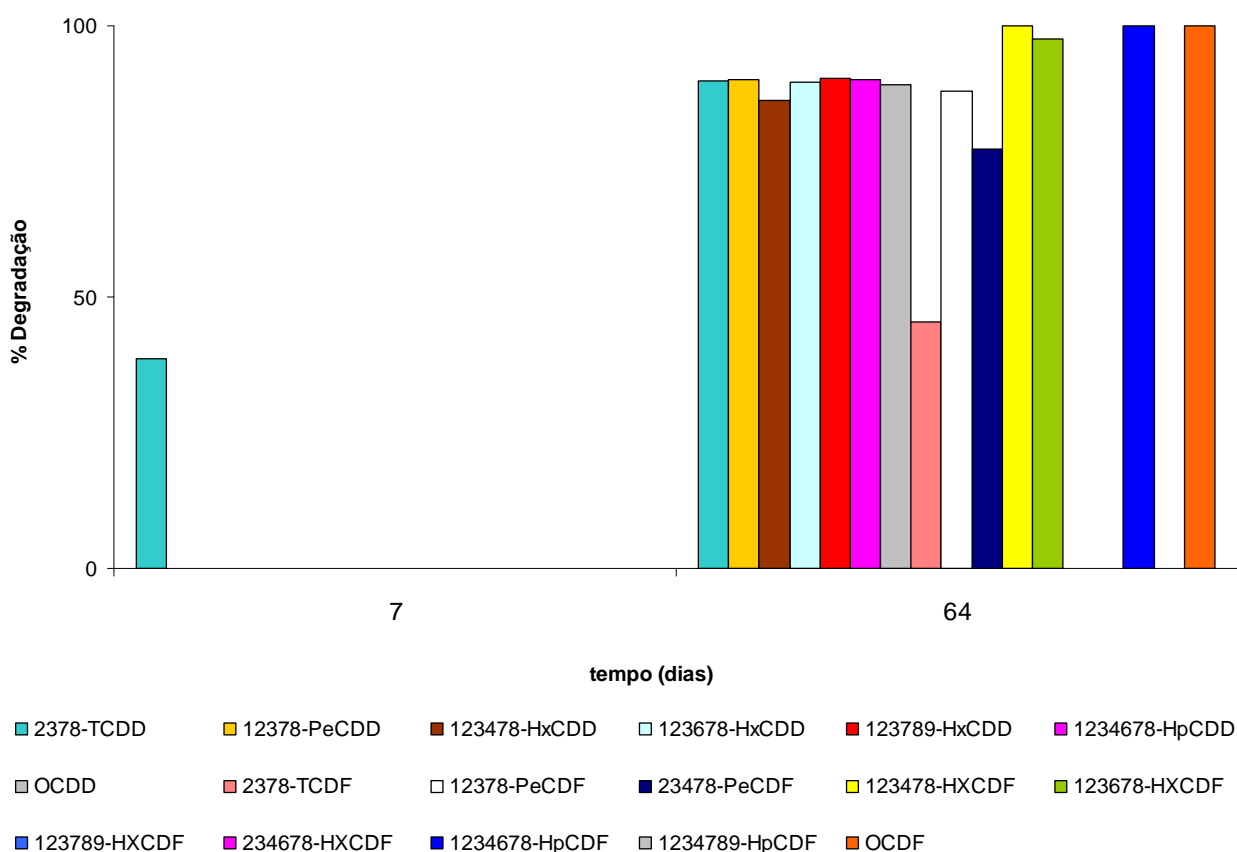


Figura 5.11. Porcentagem de degradação de PCDD/Fs feita em cinzas após 7 e 64 dias de tratamento do fungo *Pleurotus* sp CCB068. TCDD = tetraclorodibenzo- *p* -dioxina, PeCDD = pentaclorodibenzo- *p* -dioxina, HxCDD= Hexaclorodibenzo- *p* -dioxina, HpCDD = heptaclorodibenzo- *p* -dioxina, OCDD = octaclorodibenzo- *p* -dioxina, TCDF= tetraclorodibenzofurano, PeCDF = pentaclorodibenzofurano, HxCDF= hexaclorodibenzofurano, HpCDF = heptaclorodibenzofurano, OCDF = octaclorodibenzofurano

Conforme se observa na Figura 5.11, após 7 dias de cultivo, o fungo possibilitou a redução de 39% do 2,3,7,8-TCDD, composto mais tóxico da classe das dioxinas; os demais compostos presentes nas cinzas não apresentaram reduções em relação as amostras controles.

Entretanto, no 64º dia de cultivo foi observado que a maioria dos compostos se apresentaram em menores concentrações, sendo dois compostos, 1,2,3,4,7,8,-HxCDF e OCDF, não detectados nessas amostras, e portanto apresentaram 100% de degradação.

Segundo as análises, houve redução de 90% do 2,3,7,8-TCDD e também para a maioria dos compostos as reduções foram semelhantes, com exceção para 2,3,7,8-TCDF (45%).

Os compostos 1,2,3,7,8,9-HxCDF; 2,3,4,6,7,8-HxCDF e 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF não apresentaram valores reduzidos nas amostras tratadas em relação aos valores encontrados na amostras controles e portanto, foram considerados como não degradados. Os resultados obtidos nesse experimento foram muito semelhantes aos resultados obtidos por TAKADA et al (1996) utilizando *Phanerochaete sordida*. Os resultados obtidos por esses pesquisadores mostraram que o fungo avaliado também não mostrou dependência estrutural clara para a degradação de PCDD/Fs, atacando substituintes tetra a octacloro, sugerindo que a degradação destes substratos possa ser um processo via radical livre, o qual não mostra especificidade aos compostos. Muitos pesquisadores têm atribuído a degradação dos poluentes por fungos de degradação branca através de um mecanismo via radical livre, e esse comportamento foi novamente reforçado nesse experimento utilizando *Pleurotus* sp CCB 068.

Os resultados de degradação apresentados nesse trabalho apesar de serem escassos, com somente duas amostragens, sugeriram que houve redução da grande maioria dos compostos após 64 dias de cultivo do fungo em cinzas, indicando o grande potencial dessa linhagem para degradar compostos xenobióticos como o PCDD/Fs.

Estudos da degradação de PCDD/Fs no ambiente têm mostrado que estas taxas são extremamente baixas, e a meia vida do 2,3,7,8-TCDD no solo é de, aproximadamente, 1 ano. Vários grupos de pesquisas têm estudado a degradação microbiana utilizando compostos modelos de PCDD/Fs tais como dibenzo-*p*-dioxina (DD) e dibenzofurano (DF). Várias bactérias têm sido isoladas as quais podem usar DD e DF como substratos de crescimento (MORI e KONDO, 2002). *Sphingomonas* sp RW1 apresentou habilidade para mineralizar DD DF e degradar vários DD e DF mono e diclorados, entretanto essa linhagem não degradou isômeros altamente clorados (MORI e KONDO, 2002). *P. chrysosporium* e *P. sordida*, fungos de degradação branca, foram reportados como degradadores de DD e DF altamente clorados (TAKADA et al, 1996)

Segundo TAKADA et al (1996) estudos com microrganismos degradadores de PCDD/Fs são de extrema importância desde que a contaminação por misturas de químicos é muito mais

comum do que a contaminação de um único composto. TAKADA et al (1996) reportaram que os fungos *P. sordida* YK-624 e *P. chrysosporium* IFO 31249 foram capazes de degradar misturas de PCDD/Fs substituídos nas posições 2,3,7,8- tetra à octa e a avaliação da degradação dos compostos foi determinada pela redução dos compostos no meio de cultivo.

5.7 REDUÇÃO DE METAIS PESADOS

Neste trabalho também foi avaliada a remoção dos metais pesados pelo *Pleurotus* sp CCB068 e os resultados obtidos das análises nas amostras tratadas e nas amostras controles estão mostrados na Figura 5.12.

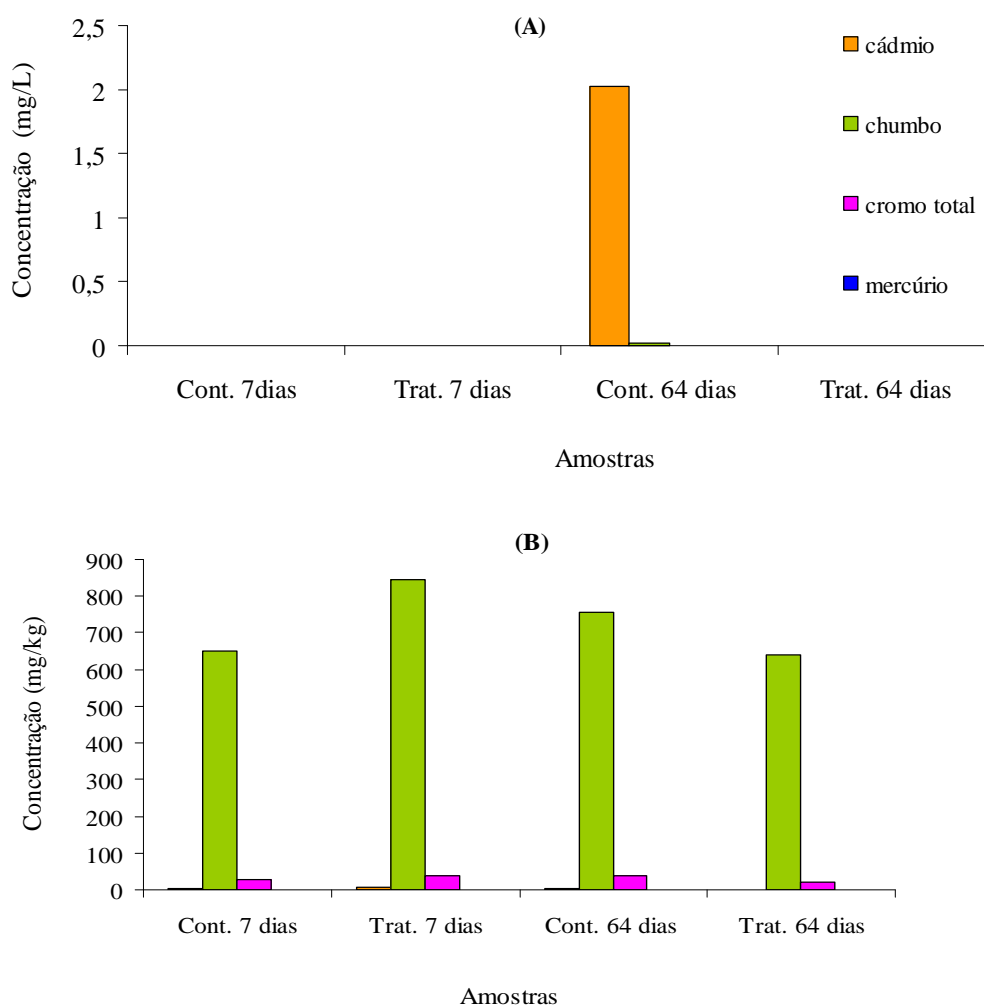


Figura 5.12. Determinação de metais pesados em amostras tratadas por *Pleurotus* sp CCB068 e amostras controles após 7 e 64 dias de experimento. (A) Sobrenadante, (B) Cinzas

Nas amostras coletadas após 7 dias de cultivo do fungo não foram detectados metais pesados no sobrenadante, das amostras tratadas com o fungo e nem no controle abiótico. Já para as cinzas coletadas das amostras tratadas com o fungo após 7 dias foram determinados níveis de chumbo e cromo total superiores aos níveis obtidos das amostras controle. Após 64 dias houve redução de 100% de cádmio e chumbo no sobrenadante das amostras, os demais metais pesados não foram detectados. As cinzas tratadas após 64 dias com o fungo apresentaram redução de 100% do cádmio. Já o chumbo foi reduzido em 15,21 % e o cromo total em 47%. Os resultados sugerem uma possível absorção dos metais pesados pelo fungo avaliado. O mercúrio não foi detectado em nenhuma das amostras avaliadas.

Diferente dos hidrocarbonetos, a biodegradação dos metais gerando CO₂ e água, não é possível. Independente das reações disponíveis, o mesmo estará presente, mas as linhagens bacterianas têm apresentado uma capacidade para concentrar ou remediá-lo ou por precipitação ou volatilização da solução de metais pesados, e portanto, tornando as soluções menos tóxicas e facilmente disponíveis. Em outras palavras, os microrganismos podem somente alterar a especificação dos metais contaminantes e convertê-los em uma forma não tóxica (SINGH e CAMEOTRA, 2004).

Todas as hifas são hábeis para ligar metais pesados em sua superfície independente da posição do corpo de frutificação ou pellet micelial em cultivo em laboratório (CURDOVÁ et al, 2004). Várias linhagens de fungos filamentosos isolados do solo de áreas industrialmente poluídas removeram de 63%-70% de cádmio durante um período de 13 dias de cultivo. Uma importante observação nesse estudo foi que embora houvesse maior produção de biomassa em culturas agitadas, a remoção de cádmio (%) foi muito maior em culturas estáticas. As linhagens podem efetivamente crescer e remover metal cádmio a uma taxa maior que 100 vezes do que se estivesse presente em seu habitat natural (MALIK, 2004).

Neste trabalho avaliou-se a capacidade biodegradativa para PCDD/Fs de 21 linhagens de fungos basidiomicetos. Dentre 7 linhagens fúngicas capazes de crescer em meio contendo PCDD/Fs que foram pré-selecionadas, 5 linhagens pertenciam ao mesmo gênero *Pleurotus*. A linhagem *Pleurotus* sp CCB068 se destacou entre as demais por produzir as maiores atividades das enzimas ligninolíticas MnP (± 19 U/L) e lacase (± 17 U/L), além de promover a redução da toxicidade do meio de cultivo contendo cinzas durante o período avaliado, e também produziu biossurfactantes. O *Pleurotus* sp. CCB068 degradou 14 compostos dentre os 17 isômeros de

PCDD/Fs após 64 dias de cultivo em meio contendo 70 g/L de cinzas. E estudos preliminares com metais pesados sugeriram ainda que essa linhagem removeu 100% de cádmio, 47 % de cromo total e 15,2 % de chumbo das cinzas após 64 dias de cultivo.

Fungos pertencentes ao gênero *Pleurotus* são microrganismos com alto valor nutricional, propriedades terapêuticas e possuem várias aplicações ambientais e biotecnológicas (COHEN; PERSKY e HADAR, 2001). São facilmente cultivados e na natureza, são encontrados na madeira usualmente morta, caules de árvores. Esse fungo está distribuído no mundo em florestas temperadas e tropicais sendo comumente encontrado em áreas temperadas.

Uma das vantagens do *Pleurotus* spp. é a habilidade para crescer em substratos ligninocelulósicos sem a necessidade de compostagem ou outro tratamento. Vários substratos, que contêm lignina e celulose, podem ser usados para o cultivo do *Pleurotus*, tais como cavacos de madeira, palha de milho, palha de arroz e outros resíduos agrícolas, alguns ainda podem ser reciclados e utilizados como ração animal ou serem empregados em preparações de outros produtos (COHEN; PERSKY e HADAR, 2001).

O sistema ligninolítico do *Pleurotus* spp tem sido extensivamente estudado em anos recentes (COHEN; PERSKY e HADAR, 2001) sendo composto principalmente de peroxidases (MnP) e lacases. A capacidade extraordinária dessas enzimas oxidativas não específicas, fazem delas interessantes para aplicação em biorremediação. As enzimas ligninolíticas podem reduzir a toxicidade do meio para o fungo e, provavelmente, podem também aumentar a disponibilidade dos compostos xenobióticos para os processos de degradação.

Pleurotus spp e suas enzimas podem servir como uma alternativa eficiente para biorremediação de compostos quando comparado com os microrganismos não ligninolíticos (COHEN; PERSKY e HADAR, 2001). E podem ser promissores para aplicação em processos de biorremediação de ambientes contaminados pois os inóculos destes fungos podem ser produzidos utilizando-se resíduos agroindustriais, como substrato de crescimento, reduzindo assim o custo do processo. Além disso os *Pleurotus* spp crescem bem em solo e podem competir com bactérias indígenas presentes no mesmo.

Com base nos resultados obtidos desse trabalho e nas vantagens apresentadas para *Pleurotus* spp., verificou-se que *Pleurotus* CCB068 é um bom candidato para aplicação em processo de biorremediação de dioxinas e furanos. Entretanto, estudos em campo visando avaliar o comportamento desta linhagem no meio ambiente frente à competição com outros

microrganismos, são necessários para confirmar a habilidade biodegradativa desta linhagem verificada em escala de laboratório.

6 CONCLUSÕES

- ❖ Entre as 21 linhagens de fungos basidiomicetos avaliadas 7 fungos foram capazes de crescer em meio contendo cinzas de incinerador contaminadas com PCDD/Fs e metais pesados. A maioria das linhagens selecionadas pertence ao gênero *Pleurotus* e são espécies de fungos comestíveis;
- ❖ As linhagens pré-selecionadas cultivadas em meio líquido contendo cinzas produziram enzimas ligninolíticas e biossurfactantes;
- ❖ A linhagem *Pleurotus* sp. (CCB068) produziu as maiores atividades de MnP, lacase e biossurfactantes durante todo o período avaliado, promoveu a diminuição da toxicidade do meio;
- ❖ Os resultados obtidos em bioensaios, utilizando sementes de alface como bioindicadores, demonstraram que essa espécie de planta apresentou uma boa sensibilidade para diferentes concentrações de dibenzofurano e a misturas de compostos PCDD/Fs presentes nas cinzas, portanto são adequadas para serem utilizadas como ferramentas bioanalíticas na avaliação da contaminação de amostras com PCDD/Fs;
- ❖ Concentrações de cinzas superiores a 70 g/L no meio mineral promoveram a diminuição da produção das enzimas MnP e lacase, além de promover um aumento na toxicidade do meio, possivelmente pelo aumento da concentração de de PCDD/Fs e metais pesados no meio os quais afetaram o crescimento do fungo;
- ❖ A técnica de SPME pode ser utilizada para extração de compostos traços em meio de cultivo, uma vez que os mesmos estejam completamente solubilizados no meio;
- ❖ O fungo sp CCB 068 degradou 74 % de dibenzofurano após 21 dias de crescimento líquido, e após 64 dias de cultivo em meio contendo PCDD/Fs o mesmo degradou 14 compostos dos 17 isômeros avaliados, além de ter removido metais pesados como chumbo, cádmio e cromo;
- ❖ Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o *Pleurotus* sp. CCB068 apresenta um potencial para biodegradação de PCDD/Fs, e por isso a sua aplicação em processos de biorremediação de locais contamiandos com PCDD/Fs pode ser viabilizada mediante estudos complementares.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGELIS, G.; ICNOMOU, D.; CHRISTOU, M.; BOKAS, D.; KOTZAILIAS, S.; CHRITOU, G.; TSAGOU, V.; PAPANIKOLAOU, S. Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. *Water Research*, v. 37, p. 3897-3904, 2003.
- ANDER, P. HATAKKA, A.; ERIKSSON, K. E. Vanillic acid metabolism by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Arch. Microbiol.*, v. 125, p. 189-202, 1980.
- ANON. Dioxin in animal feed: Belgian crisis has worldwide impact. *World Food Regulation Review*, v. 9, n. 2, p. 23-25, 1999.
- ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2000. *Análise de Dioxinas e Furanos- Programa de Monitoramento em Leite 1999/2000*, Report, vol. 1-3.
- ARORA, D.S.; GILL, P.K. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. *Enzyme and Microbiology*, v. 28, p. 602-605, 2001.
- ASSUNÇÃO, J V de; PESQUERO, R.C. Dioxinas e furanos : origens e risco. *REV. Saúde Pública*, v. 33, n. 5, p. 523-530, 1999.
- BAIRD, C. *Environmental Chemistry*. New York: W. H. Freeman and Company, 1995, p. 241-323.
- BALDRIAN, P. GABRIEL, J. Cooper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 206, p. 69-74, 2002.
- BARR, D. P.; AUST, S. D. Mechanisms white-rot fungi use the degrade pollutants. *Environmental Science & Technology*, v. 28(2), p. 78-87, 1994.
- BAUD-GRASSETA, F.; BAUD-GRASSETA, S.; SAFFERMANA, S. Evalaution of the bioremediation of a contaminated soil with phytotoxicity tests. *Chemosphere*, v. 26, n. 7, p. 1365-1374, 1993.
- BEARD, A.; NAIKWADI, K.; KARASEK, F.W. Comparison of extraction methods for polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in fly ash using gas chromatography - mass spectrometry. *J. Chromatog.*, v. 589, p. 265 - 270, 1992.
- BERTRAND, G. Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans suc de quelques champignons *C.R. Hebd Seances Acad Sci.*, v. 123, p. 463-465, 1896.

- BEZALEL, L.; HADAR, Y.; CERNIGLIA, C.E Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the White rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied Environmental Microbiology*, v. 62, p. 2547-2553, 1996.
- BIANCHI, D., BOSTTI, A., CIDARIA, D., BERNARDI, A, GAGLIARDI, I., D'AMICO P. Oxidation of Polycyclic Aromatic Heterocycles by *Pseudomonas fluoresces* TTCl. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 47, p. 596-599, 1997.
- BOLLAG, J. -M., SHUTTLEWORTH, K. L. & ANDERSON, D. H. Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 54, p. 3086-3091, 1988
- BONO, J.J., GOULAS, P., BOE, J.F., PORTET, N. & SERIS, J.L. Effect of Mn (II) on reactions catalyzed by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Eua. J. Biochem*, v. 192, p. 189-193, 1990.
- BRAGA, A. M. C. B.; KRAUSS, T.; REIS DOS SANTOD, C.R; SOUZA, P. M. PCDD/F contamination in a hexachlorocyclohexane waste site in Rio de Janeiro, Brazil. *Chemosphere*, v.46, p. 1229-1333, 2002.
- BREIVIK, K.; ALCOCK, R.; LI, Y-F.; BAILEY, R.E.; FIEDLER, H.;PACYNA, J.M. Primary source of selected POP'S : regional and global scale emission inventories. *Environ. Pollution.*,v. 128, p. 3-16, 2004.
- BUMPUS, J.A. & AUST, S.D. Biodegradation of environmental pollutants by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioessays*, v. 6, p. 166-170, 1987.
- BUMPUS, J. A. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 55, p. 154-158, 1989.
- BUMPUS, J. A; TIEN, M.; WHIIGHT, D.; AUST, S. D. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science*, v. 228, p. 1434-1436, 1985.
- BUNZ, P. V, SCHIMIDT, S. The microbial degradation of halogenated diaryl ethers. *Biotechnology Advances*, v. 15, n. 3/4, p. 621-632, 1997.
- BUSWELL, J. A; OLDIR, E. Lignin biodegradation. *CRC Crit. Rev. Biotec*, v. 6, p. 1-60, 1987.
- CALL, H. P. & MÜCKE, I. History overview and applications of mediated ligninolytic systems especially laccase-mediator-systems (Lignozym-process). *J. Biotechnol.*, v. 53, p. 63-, 1997.
- CAMARERO, S.; BÖCKLE, B.; MARTINEZ, M.J.; MARTINEZ, A. Z. Manganese-mediated lignin degradation by *Pleurotus pulmonaris*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.62. p. 1070-1072., 1996.

- CAMEOTRA, S. S.; BOLLAG, J-M. Biosurfactant - enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 30, n. 2, p. 111-126, 2003.
- CAMERON, M. D.; TIMOFEEVSKI, S.; AUSTIN S. D. Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 54, p. 751-758, 2000.
- CARVALHAES, G. K.; BROOKS, P.; MARQUES, C. G.; AZEVEDO, J. A. T. ; MACHADO, M. S. C. ; AZEVEDO, G. C. Lime as the source of PCDD/F contamination in citrus pulp pellets from Brazil and status of the monitoring program. *Chemosphere*, v. 46, n. 9/10, p. 1413-1426, 2002.
- CERNIGLIA, C. E., MORGAN, J. C., GIBSON, D. T. Bacterial and fungal oxidation of dibenzofuran. *Biochem. J.*, v. 180, p. 175-185, 1979.
- CHANG, M-B; CHUNG, Y. T. Dioxins contents in fly ashes of MSW Incinerator in Taiwan. *Chemosphere*. v. 36(9), p. 1959-1968, 1998.
- CHIVUKULA, M. & RENGANATHAN, V. Phenolic azo-dye oxidation by laccase from *Pyricularia orizae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 61, p. 4374-4377 1995.
- CLEMENTE, A. R.; ANAZAWA, T. A.; DURRANT, L. R. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil fungi. *Brasilian Journal of Microbiology*, v. 32, p. 255-261, 2001.
- CLEMENTE, A.R.. Degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos por fungos ligninolíticos e sua aplicação em biorremediação de solos contaminados. 2002. 159p. Tese (Doutor em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- COHEN, R.; PERSKY L.; HADAR, Y. Mini – review. Biotechnological applications and potential of wood- degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *App. Microbiol. and Biotechnol.*, p.1-24, 2001.
- COLLA, L.M.; COSTA, J. A. V. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. *Vetor Rio Grande*, v. 13, p. 67-84, 2003.
- COOPER, D. V.; GOLDENBERG, B. G. Surface – active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53 (2), p. 224-229, 1989.
- CURDIVÁ, E.; VAVRUSKOKÁ, L.; SUCHÁNEK, M.; BALDRIAN, P.; GABRIEL, J. ICP-MS determination of heavy metals in submerged cultures of wood- rotting fungi. *Talanta*, v.62, p. 483-487, 2004.

- DA COSTA, J.G.(2004). Degradação de bifenilos policlorados (PCBs) e ácidos clorobenzoicos por bactérias aeróbias isoladas de ambientes contaminados.2004, 106p. Tese (Doutor em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- DOMINGO, J. L.; GRANERO, S.; SCHUHMSCHER, M. Congener profiles of PCDD/Fs in soil and vegetation samples collected near to a municipal waste incinerator. *Chemosphere*,. v. 43, p. 517-524, 2001.
- DOS REIS , M. F. Estudo da movimentação dos herbicidas em colunas de solo.1999, 109p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial)- Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 1999.
- DUKA, B.J. (1989) Methods for microbiological and toxicological analysis of waters and sediments. National Water Research Institute Environment Canada: Burlington, Ontario, Canada.
- DÚRAN, N; ESPÓSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: A review. *Appl. Catal. B: Environ.* v. 28, p. 83-99, 2000.
- DURSUN, A.Y.; ULSU, G.; CUCI, Y.; AKSU; Z. Bioaccumulation of copper (II), lead (II) and chromium (VI) by growing *Aspergillus niger*. *Process Biochem.*v. 38, n.10, p. 1647-51, 2003.
- ECKE, H.; SAKANAKURA, H.; MATSUTO, T.; TANAKA, N.; LAGERK-VIST; A. State of the art treatment process for municipal solid waste incineration residues in Japan.Waste Management and Research, v. 18, p 41-51, 2000.
- EGGEN, T. Application of fungal substrate from commercial mushroom production – *Pleurotus ostreatus*- for bioremediation of creosoto contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. v. 44, p.117-126, 1999.
- ENGWALL, M.; HJELM, K. Uptake of dioxin like compounds from sewage sludge into various plant species- assessment of levels using a sensitive bioassay. *Chemosphere*, v. 40, p. 1189-1195, 2000.
- ERICKSSON, K.E. Biotechnology in the pulp and paper industry. *Wood Sci. Technol.* v. 24, p.79-101, 1990.
- ERIKSSON, K. E., JOHNSRUD, S. C. & VALLANDER, L Degradation of lignin and lignin model compounds by various mutants of the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Arch. Microbiol.*, v. 135, p.. 161-168, 1983

- FACCHETTI, S.; BALASSO, A.; FICHTNER, C.; FLARE, G.; LEONI, A; MAURI, C. & VASCONI, M. (1986) Studies on the absorption of TCDD by plant species. In: Rappe, C., Choudhary, G. & Keith, LH, ed. Chlorinated dioxins and dibenzofurans in perspective. Chelsea, Michigan: Lewis Publisher, 1986, p. 225-239.
- FAIREY, R.; TABERSKI, K.; LAMERDIN, S.; JOHNSON, E.; CLARK, R.P.; DOWNING, J. W.; NEWMAN, J.; PETREAS, M. Organochlorines and other environmental contaminants in muscle tissues of sportfish collected from San Francisc Bay. *Mar. Pollut. Bull.*, v. 34, n. 12, p. 1058- 1071, 1997.
- FARRÉ, M.; BARCELÓ, D. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *Trends in Anal. Chem.*, v. 22, n. 5, p. 299-309, 2003.
- FEIL, V. J.; ELLIS, R. L. The USDA perspective on dioxin concentrations in dairy and beef. *J. of Anim. Sci.*, v. 76, n. 1, p. 152-159, 1998.
- FENGEL, D., WEGENER, G.(eds.) Wood-Chemistry Ultrastruture, Reactions. Berlin: Walter de Gruyter,1989. 613p.
- FIEDLER, H.; COOPER, K. R.; BERGEK, S.; HJELT, M.; RAPPE, C. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans (PCDD/PCDF) in food samples colleted in Sourthern Mississipi, USA. *Chemosphere*, v. 34, n. 5/7, p. 1411-1412, 1997.
- FIELD, J. A.; DE JONG, E. FEIJOO-COSTA, G. DE BONT, J. AM. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. Elsevier. Science Publish Ltda.(VIQ) v. 11, p. 44-48, 1993.
- FRANCY, D. S.; THOMAS, J. M.; RAYMOND, R. L.; WARD, C. H. Emulsification of hydrocarbon by subsurface bacteria. *J. Ind. Microbiol.*, v. 8, p. 237-246, 1991.
- FRIES, G. F. Areview of the significance of animal food products as potencial pathways of human exposures to dioxins. *J. Anim. Sci.*, v.73, p. 1639-1650, 1995.
- GIANFREDA, L. RAO, M.A. Potential of extracellular unzymes in remediation of polluted soils: a review . *Enzyme and Microbial Technology*,v. 35, p. 339-354, 2004.
- GOLD, M. H; ALIC, M. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* *Microbiol Rev.*, v. 57, n.3, p.606-622, 1993
- GOLD, M.H; WARIISHI, H.; VALLI, K. Extracellular peroxidase involved in lignin degradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *ACS Symp. Sci.*, v. 389, p. 127-140, 1989.

- GLENN, J.K. & GOLD, M.H. Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading Basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 242, p. 329-341, 1985.
- GLENN, J. K. MORGAN, M. A; MAYFIELD, MB; KUWAHARA, M GOLD, MH. An extracellular H₂O₂-requiring enzyme preparation involved in the lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, v. 114, p.1077-1083, 1983.
- GROSSI, G.; LICHTIG, J.; KRAUBI, P. PCDD/F; PCB and PAH content of Brazilian compost . *Chemosphere*, v. 37, n. 9/12, p.2153-2160, 1998.
- HABE, H.; IDE, K.; YOTSUMOTO, M.; TSUJI, H.; YOSHIDA, T.;NOJIRI, H.; OMORI, T. Degradation characteristics of dibenzofuran – degrader *Terrabacter* sp strain DBF63 toward chlorinated dioxins in soil. *Chemosphere*, v. 48, p. 201-207, 2002.
- HAMMEL, K. E.; KALYANARAMAN, B.; KIRK, T. K.. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo-p-dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. *J. Bio. Chem.*, v.261, p.16948-16952, 1986
- HAMMER, E., KROWAS, D., SCHAFER, A, SPECHT, M., FRANCKE, W., SHAVER, F. Isolation and Characterization of a Dibenzofuran-Degrading Yeast: Identification of Oxidation and Ring Cleavage Products. *App. Environ. Microbiol.*, v. 64, n.6, p.2215-2219, 1998.
- HARRISON, R.O.; EDULJEE, G.H. Immunochemical analyses for dioxins-progress and prospects. *The Science of the total Environ.*, v. 239, p.1-18, 1999.
- HATAKKA, A.. Lignin-modifying enzymes from selected white- rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 13, p.125-135, 1994.
- HEAD, I. M. Bioremediation: towards a credible technology. *Microbiology*, v. 144, p.599-608, 1998.
- HEBERT, C. E.; GAMBERG, M.; ELKIN, B. T.; SIMON, M.; NORSTROM, R. J. Polychlorinated dibenzo--dioxins, dibenzofurans and non-ortho substituted polychlorinated biphenyls in caribou (*Rangifer tarandus*) from the Canadian Arctic. *Sci. of the Total Environ.*, v 183, n. 3, p.195- 204, 1996.
- HESTER, R.E.; HARRISON, R. M. Issues in environmental science and technology,v2. Waste Incineration and the environment,: Eduljee, G. H., Bath Press, 1994..
- HIGUCHI, T. Lignin biochemistry and biodegradation. *Wood Sc. Technol.*, v.24, p.23-63, 1990.

- HÖFER, C. ; SCHLOSSER, D.. Novel enzymatic oxidation of Mn^{2+} to Mn^{3+} catalysed by a fungal laccase. *FEBS Letters*, v. 451, p. 186-190, 1999.
- HOFRICHTER, M.; VARES, K.; SCHEIBNER, K.; GALKIN, S.; SIPILA, J. ; HATAKKA, A. Mineralization and solubilization of synthetic lignin by manganese peroxidases from *Nematoloma frowardii* and *Phlebia radiata*. *J. Biotechnol.*, v. 67, p.217-228, 1999.
- HONG, H. B.; CHANG, Y. S.; CHOI, D. S.; PARK, Y. H.. Degradation of Dibenzofuran by *Pseudomonas putida* PH 01. *Was. Res.*, v. 34, n. 8, p.24024-2407, 2000.
- HOOGENBOOM, R.; PORTIER, L; ONSTENK, C; POLMAN, T.; HAMERS, A., TRAAG, W. Determination of dioxins and planar PCBs in fish using the CG/MS and CALUX bioassay. Introduction of the screening approach for control purposes. *Organohalogen Compound.*, v.45, p.236-239., 2000.
- HUANG, Y.; TAKAOKA, M.; TAKEDA, N. Chlorobenzenes removal from municipal solid waste incineration fly ash by surfactant-assisted column flotation. *Chemosphere*, v.52, p.735-743, 2003.
- JIMÉNEZ, B.; ELJARRAT, E.; HERNÁNDEZ, L. M.; RIVERA, J.; GONZÁLEZ, M. J. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in soils near a clinical waste incinerator in Madrid, Spain. Chemometric comparison with other pollution sources and soils. *Chemosphere*, v. 32, n. 7, p.1327-1348, 1996.
- JOSHI, D. K.; GOLD, M. H. Oxidation of dibenzo-p-dioxin by lignin peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry*, v.33, p.10969-10976, 1994.
- JONHSON, V.; SINGHI, M.; SAINI, V. S.; DILIP, K. A.; SISTA, VEYADAV, M. Bioemulsifier production by oleaginous yeast *Rhotorula glutinis* II-P-30. *Biotechnology Letters*, v. 14, n. 6, p.487 - 490, 1992.
- KAO, C. M. ; CHEN, S. C.; LIU; J. K.; WU, M. J. Evaluation of TCDD biodegradability under different redox conditions. *Chemosphere*, v. 44, p.1447-1454, 2001.
- KARAM, J. NICELL, J. A. Potential applications of enzymes in waste treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v. 69, p.141-147, 1997.
- KIRK., T. K.; FARRELL, R. L. Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. *Ann. Rev. Microbiol.*, v. 41, p. 465-505, 1987.
- KAO, C. M. ; CHEN, S. C.; LIU; J. K.; WU, M. J. Evaluation of TCDD biodegradability under different redox conditions. *Chemosphere*, v. 44, p. 1447-1454, 2001.

- KASUGA, K.; NOJIRI, H.; YAMANE, H.; OMORI, T.. Genes of enzymes involved in the biodegradation of Carbazole, Dibenzofuran, Fluorene and Dibenzo-p-dioxin by bacteria. *Wat. Sci. Tech.*, v. 36, n. 10, p. 9-16, 1997.
- KEARNY, P. C., WOOLSON, E. A, ELLINGTON C. P. Jr. Persistence and metabolism of chlorodioxins in soils. *Environ. Sci. Technol.*, v. 6, p. 1017-1019, 1972.
- KEUM, Y.S. & LI, Q. X. Fungal laccase- catalysed degradation of hydroxyl polychlorinated biphenyls. *Chemosphere*, v. 56, p. 23-30, 2004.
- KLECKA, G. M, GIBSON, D. T. Metabolism of dibenzo-p-dioxin and chlorinated dibenzo-p-dioxins by a *Beijerinckia* species. *App. Environ. Microbiol.*, v. 39, p. 288-296, 1980.
- KÖLLER, G.; MÖDER, M.; CZIHAL, K. Peroxidative degradation of selected PCB: a mechanistic study. *Chemosphere*, v.41, p. 1827-1834, 2000.
- KRAUSS, T.; BRAGA, A. M. C.B.; ; MARINS, E. R.; CARVALHAES, G.; BROOKS, P. PCDD/F concentration in the surroundings of a Cement Kilm/co-processing waste plant in Rio de Janeiro. *Organohalogen Compounds*, v. 41, p. 215-218, 1999.
- KUBÁTOVÁ, A.; ERBANOVÁ, P.; EICHLEROVÁ, I.; HOMOLKA, L.; NERUD, F.; SASEK, V. PCB congenere selective biodegradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in contaminated soil. *Chemosphere*, v.43, p. 207-215, 2001.
- KUWAHARA, M.; GLENN, J. K; MORGAN, M. A; GOLD, M.H Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.*, v. 169, p. 247-250, 1984.
- LABORDE, J. Sur la casse des vins C.R. Hebd Seances Acad Sci. v. 123, p. 1074-1075, 1896
- LACKNER, R.; SREBOTNIK, E.; MESSNER, K. Oxidative degradation of high molecular weight chlorolignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 178, p. 1092-1098, 1991.
- LAO, K.L; TSANG, Y.Y.; CHIU, S. W. Use of spent mushroom compost to bioremediate PAH-contaminated samples. *Chemosphere*, v.52, p. 1539-1546, 2003.
- LAU, K. L ; TSANG, Y.Y., CHIU, S. W. Use of spent mushroom compost to bioremediate PAH-contaminated samples. *Chemosphere*, v. 52, p. 1539-1546, 2003.
- LEONOWICZ, A., SZKLARZ, G. & WOJTAS-WASILEWSKA, M. The effect of fungal laccase on fractionated lignosulphonates (Peritan Na) *Phytochem.*, v. 24, p. 393-396, 1985
- LEVIN, L.; VIALE, A.; FORCHIASSIN, A. Degradation of organic pollutants by the white rot basidiomycete *Trametes trogii*. *Internat. Biodet. & Biodeg.*, v. 52, p.1-5, 2003.

- MACDONALD, D. D.; IKONOMOU, M. G.; RANTALAINEN, A. L.; ROGERS, I. H. Contaminates in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) from the upper Fraser River, British Columbia, Canada. *Environ. Toxicol. and Chem.*, v. 16, n. 3, p. 479-490, 1997.
- MALLIK, A. Metal bioremediation through growing cells. *Environment International*, v. 30, p.261-278, 2004.
- MARTY, G. D.; WETZLICH, S.; NUNEZ, L. M.; CRAIGMILL, A.; HINTON, D. E. Fish-based biomonitoring to determine toxic characteristics of complex chemical mixture: documentation of bioremediation at a pesticide disposal site. *Aquat. Toxicol.*, v. 19, p. 329-340, 1991.
- MATSUMURA, F., BENEZET H. J. Studies on the bioaccumulation and microbial degradation of 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Environ. Health Perspect.*, v. 5, p. 253-258, 1973.
- MCGUIRL, M. A. & DOOLEY, D. M. Copper-containing oxidases. *Curr. Opinion Chem. Biol.*, v. 3, p. 138-144, 1999.
- MELLO, I. S. DE; AZEVEDO, J. L. DE (eds). Microbiologia Ambiental. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1997, 440p.
- MONNA, L.; OMORI, T.; KODAMA, T. Microbial degradation of dibenzofuran, fluorene and dibenzo-p-dioxin by *Staphylococcus aureus* DBF63. *Applied and Environmental Microbiology*, v.59, n. 1, p.285-289, 1993.
- MORI, T. & KONDO, R. Oxidation of chlorinated dibenzo-p-dioxin and dibenzofuran by white rot fungus *Plebia lindtneri*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 216, p.223-227, 2002.
- OLIVEIRA, M. C.N. Avaliação de compostos orgânicos provenientes das queima de palha de cana-de -açúcar em Araquara em comparação com medições efetuadas em São Paulo e Cubatão: resultados parciais São Paulo: CETESB; 1996.
- ONODERA, S.; SUGIMOTO, M.; TAKAGI, T.; TANAKA, K. Levels and patterns of polychlorinated dibenzo-p-dioxin and dibenzofuran contamination in fish samples from midstream of the Tama River, near municipal waste incineration plant, Japan. *J. of Environ. Chem.*, v. 9, n. 3, p 653-659, 1999.
- PAICE, M.G.; REID, I. D.; BOURBONNAIS, R; ARCHIBALD, F.S.; JURASEK, L. Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching demethylases and delignifies kraft pulp. *Appl. Environm. Microbiol.*, v. 59, p. 260-265, 1993.
- PARSONS, J. R., STORMS, M. C. M. Biodegradation of chlorinated dibenzo-p-dioxins in batch and continuous cultures of strain JB1. *Chemosphere*, v. 19, p. 1297-1308, 1989.

- PARSONS, J.,R., RATSACK, C., SIEKERMANN, C. Biodegradation of chlorinated dibenzofurans by na *Alcaligenes* strain . In: ORGANOHALOGEN COMPOUNDS 1. Dioxin 90. EPR-seminar. Edited by Hutzinger O, Fiedler H., Bayreuth, Germany, p. 377-389 1990.
- PASZCZYNSKI, A; HUYNH, V. B.; CRAWFORD, R. Enzymatic activities of an extracellular, manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiol. Lett. v. 29, p.37-41, 1985.
- PARASZLIEWICZ, K.; KANWAL, A; PDLUGONSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. *Journal of Biotechnology*, v. 92. p. 287-294, 2002.
- PELLIZARI, V.H. Biodegradação de PCBs . In: SILVA, C.M.S.; ROQUE, M.R.A; MELO, I.S. (Eds.) Microbiologia ambiental. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000.98p.
- PEREZ, J.; JEFFRIES, T. W. Roles of manganese and organic acid chelators in regulating lignin degradation and biosynthesis of peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environm. Microbiol.*, v. 58, p. 2402-2409, 1992.
- PHILIPPI, M. KRANOBABEW, V., ZEYER, J., HÜTTER, R. Fate of TCDD in microbial cultures and in soil under laboratory conditions. New York: Academic press, 1981, p. 221-233.
- PHILIPPI, M., SCHMID, J., WIPF, H-K, HÜTTER, R. A microbial metabolite of TCDD. *Experientia*, v. 38, p. 659-661, 1982.
- PISA, F.F.; MANFIO, G.P. Evidence for reduced archaeal and bacterial diversity in polluted estuarine sediments in Baixada Santista (SP, Brazil). In: ENCONTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA AMNBIANTAL, 8., 2002. Rio de Janeiro, Anais...2002, p. 182.
- POINTING, S.B. Feasibility of bioremediation by White rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 57, p. 30-33, 2001.
- QUENSEN, J. F., MATSUMURA, F. Oxidative degradation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by microorganisms. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 2, p. 261-268, 1983.
- RAGHUKUMAR, C., D'SOUZA, T. M., THORN, R. G., REDDY, C.A Lignin- Modifying Enzymes of *Flavodon flavus*, a Basidiomycete Isolated from a Coastal Marine Environment. *App. Environ. Microbiol.*, v. 65, n. 5, p.2103-2111, 1999.
- REDDY, C.A & D'SOUZA, T. M. Physiology and molecular biology of the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.13, p.137-152, 1994.

- RENGANATHAN, V. GOLD, M. H Spectral characterization of the oxidized states of lignin peroxidase an extracellular enzyme from the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemistry* v.25, p. 25, p. 1626-1631, 1986.
- RENOUX, A. Y.; TYAGI, R. D.; SANSON, R. Assessment of toxicity reduction after metal removal in bioleached sewage sludge. *Water Resource*, v. 35, n. 6, p. 415-424, 2000.
- RESNICK, S. M., GIBSON, D. T. Regio – and stereospecific oxidation of fluoreno, dibenzofuran and dibenzothiophene by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. NC1B 9816. *App. Environ. Microbiol.*, v. 62, p. 4073-4080, 1996.
- RICE, M D. A. Consequences of exposure from Persistent Organic Pollutants (POP's) : Session x Summary and Research Need. *Neurotoxicology*, 2003. *In Press*
- RINGLING, D. & VAN ALFEN, N. K. Extra- and Intracellular laccases of the Chestnut Blight Fungus, *Cryphonectria parasitica* *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 59, p.3634-3639, 1993
- ROBIDOUX, P. Y.; LOPEZ-GASTEY, J.; CHOUCRI, A.; SUNAHARA, G. I. Procedure to screen illicit discharge of toxic substances in septic sludge received at a waste water treatment plant. *Ecotoxicological and Environmental Safety*, v. 39, p. 31- 40, 1998.
- ROMANTSCHUCK, M.; SARAND, I.; PETÄNEW, T.; PETTOLA, R.; JONSSON-VIHANNE, M.; KOIVULA, T.; YRJALÄ, K.; HAAHTELA, K. Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. *Environmental Pollution*, v. 107, p.179-185, 2000.
- ROMERO, M.C.; HAMMER, E.; CAZAU, M.C.; ARAMBARRI, A. M. Isolation and characterization of biaryllic structure – degrading yeasts : hydroxylation potential of dibenzofuran. *Environmental Pollution*, v. 118, p. 379-382, 2002.
- ROSENBROCK, P., MARTENS, R., BUSCOT, F., ZADRAZIL, F., MUNCH, J. C.. Enhancing the mineralization of [U-C-14]dibenzo-p-dioxin in three different soils by addition of organic substrate or inoculation with white-rot fungi. *App. Microbiol. Biotech.*, v. 48, n. 5, p.665-670, 1997.
- RUIZ-AGUILAR GRACIELA, M. L.; SANCHEZ, J. M. F.; VAZQUEZU, R. R.; POGGI-VARALDO, H. Degradation by white-rot fungi of high concentrations of PCB extracted from contaminated soil. *Advances in Environmental*, 2001, *In press*.
- SAKAI, S.; URANO, S.; TAKATSUKI, H. Leaching behavior of PCBs and PCDD/Fs from some waste materials. *Waste Management*, v. 20, p. 241-247, 2000.

- SALAFRANCA, J.; DOMÑO, C.; FERNANDEZ, C. NERIN, C. Experimental design applied to the determine of several contaminants in Duero River by solid – phase microextraction. *Analytica Chimica Acta*, v. 477, p. 257-267, 2003.
- SANGLARD, D.; LEISOLA, M. S. A., FIEDCHTER, A. Role of extracelullar ligninases in biodegradation of benzo(a)pyrene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microbio. Technol.*, v.8, p. 209-212, 1986.
- SATO, A.; WATANABE, T.; WATANABE, Y.; HARAZONO, K.; FUKATSU, T. Screening for basiomycetous fungi capable of degrading 2,7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.213, p.213-217, 2002.
- SCHRAMM, K-M; KLIM, C.; HOFMAIER, A.; KETTRUP, A. Comparision of dioxin-like-response in vitro and chemical analyses of emissions and materials. *Chemosphere*, v. 42, p. 551-557, 2000.
- SCHREINER, G., WIEDMANN, T., SCHIMMEL, H., BALLSCHMITTER, K. Influence of the substituiton pattern on the microbiol degradation of mono- to tetrachlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans. *Chemosphere*, v. 34, p. 315-1331, 1997.
- SCHUMAHMACHER, M.; GRANERO, S.; RIVERA, J.; MÜLLER, L.; LLOBET, J. M.; DOMINGO, J. L. Atmospheric deposition of PCDD/Fs near and old municipal solid waste incinerator: levels in soil and vegetation. *Chemosphere*, v. 40, p. 593-600, 2000.
- SHARMA, S. ; DASTIDAR, M. G.; SREEKRINHNAN, T.R. Biological removal of zinc from wastewater using *Aspergillus niger* spp. *Eur. J. Miner. Process Environ. Protect.*, v. 3, n. 1, p.1-4, 2003.
- SHERRY, J. Environmental immunoassays and other bioanalytical methods: overview and update. *Chemosphere*, v. 34, n. 5/7, p.1011-1027, 1997.
- SCHOEMAKER, H. E. On the chemistry of lignin biodegradation. Recl. Trav. Chim. Pays-Bas Neth. vol. 109, pp. 255 – 272, 1990.
- SINGHI, P.; CAMEOTRA, S.S. Enhancement of metal bioremediation by ise of microbial susfactants . *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 319, p. 291-297, 2004.
- SMITH, M.; THURSTON, C. F. & WOOD, D. A. Fungal laccase: role in delignification and possible industrial applications. In: A. Messerrschmidt (Ed). Multi-copper oxidases. World Scientific: Singapore. p. 201-207, 1997.

- STOTZKY, G.; BURNS, R.G. (1982). The soil environment clay-humus-microbe interactions. In Burns, R.G., Slatern J. H (Eds). *Experimentam microbial Ecology*. Blackwell Publications, Oxford, London, pp. 105-133.
- SZKLARZ, G. D.; ANTIBUS, R. K, SINSABAUGAUGH, R.L; LINKINS, A. E. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. *Mycolo.*, .v.81, p. 234-240, 1989.
- TAKADA, S.; NAKAMURA, M.; MATSUEDA, T.; KONDO, R.; SAKAI, K. Degradation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *Appl Environm. Microbiol.*, v.62, p. 4323-4328, 1996.
- TAKADA, S., MATSUEDA T., KONDO, R., SAKAI, K. Degration of dioxins in fly ash by *Phanerochaete sordida* YK-624. *In Situ and on site Bioremediation .v.2. Fungal Technologies* p.545-549, 1999.
- TAKASUGA, T.; MAKINO, T. ; TSUBOTA, K.; TAKEDA, N. Formation of dioxins (PCDDs/PCDFs) by dioxin –free fly ash as a catalytic and relation with several chlorine sources. *Chemosphere*, v. 40, p.1003-1007, 2000.
- THOMAS, D.R.; CARSWELL, K. S.; GEORGIOU, G. Mineralization of biphenyle and PCBs by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotech. Bioeng.*, v. 40: p. 1395-1402, 1992
- THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. *Microbiol.*, v. 140, p. 19-26, 1994
- TIEN, M. & KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Burds. Science*, v. 221, p.661-663, 1983
- TIEN, M. and KIRK, T. K. (1988). “Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*”. Methods Enzymol. 161: 238-249.
- TIEN. M, & KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂ requiring oxygenase. In: *Proceedings of the National Academy of Science USA*,. v. 81, p. 2280-2284, 1984
- TOMAZ, R.M.A.G.; FRANCO, T.T.; DURRANT, L.R. Biodegradação do herbicida Staple 280CS por fungos. *In.:I Congresso de Meio Ambiente*. Paulínia, SP, 21-25/06/2004, ID-72, p. 190.
- TUOMELA, M.; VIKMAN, M; HATAKKA, A.; ITAIAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment. A review. *Biores. Tech.*,v. 72, p. 169-183, 2000.
- TUOR, U; WINTERHALTER, K & FIECHTER, A. Enzumes of white rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *J. Biotech.*, v. 41, p. -17, 1995.

- U .S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Interim procedures for estimating risks associated with exposures tom mixtures of chlorionated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (CDDs and CDFs) and 1989 update.In: US Environmental Protection Agency , Risk Assessment Forum. Washinton, D.C, EPA/625/3-89/016 (1989).
- U .S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). Method 1613: Tetra- trohgh octa-chlorinated dioxins and furans by isotope dilution HRGC/HRMS. [Washington], October /1994.77p.
- U .S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA) .Method 8290 : Polychorinated dibenzodioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) by high resolution gas chromatography / high – resolution mass spectrometry (HRGC/ HRMS). September/ 1994, 71p.
- VALLI, K.; WARIISHI, H.; GOLD, M.H Degradation of 2,7-diclorodibenzo-p-dioxin by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Bacteriol.*, v. 174, p. 2131-2137, 1992.
- VAN OVERMEIRE, I.; GOEYENS, L.; BEERNAERT, H.; SREBRNIK, S.; DE POORTER, G.; BAEYEN, W.; CLARK, G.; CHU, M.; CHU, A.; CHU D.; MORRIS, R.; BROWN, D. A comparative study of GC-HRMS and CALUX –TEQ determinations in food samples by the Belgian Federal Ministries of Public Health and Agriculture. *Organohalogen Compounds*, v. 45, p. 196-199, 2000.
- VOLKERING, F.; BREVRE, A. M.;RULKENS, W. H. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation*, v. 8, p. 401-417, 1998.
- YETIS, U.; DOLEK, A; DILEK, F. B.; OZCENGIZ, G. The renoval of PB (II) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Wat. Res.*, v. 34, p. 4090-4100, 2000.
- YOSHIDA, H. Chemistry of Lacquer (Urushi) part 1 *Chem. Soc.*, v. 43, p. 472-486, 1883.
- ZECHENDOOF, B. Sustainable development : how can biotechnology contribute?. *Tibtech.* ,v.17, p.219-225, 1999.
- WARD, C. T.; MATSUMURA, F. Fate of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in a model aquatic environment. *Arch Environmental Cotam. Toxicology*, v. 7, p. 349-357, 1978.
- WARIISHI, H. GOLD, M. H. Lignin peroxidase compound III. Mechanism of formation and decomposition. *J. Biol. Chem.*, v. 265, p. 2070-2077, 1990.
- WARIISHI, H.; VALII, K.; GOLD, M. Hin vitro depolymerization of lignin by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophy. Res. Comm.*, v. 176, p. 269-275, 1991.

- WINDAL, I.; EPPE, G.; GRIDELET, A C.; DE PAUW, E. Supercritical fluid extraction of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins from fly ash: the importance of fly ash origin and composition on extraction efficiency. *J. Chromatogr.*, v.819, p. 187 - 195, 1998.
- WITTICH, R-M. Degradation on dioxin - like compounds by microorganisms. *App. Microbiol. Biotechnol.*, v. 49, p. 489 - 499, 1998.
- WITTICH, R. M., WILKES, H. SINNEWELL, V., FRANCKE, W., FORTANAGEL, P. Metabolism of Dibenzo-*p*-dioxin by *Sphingomonas* sp. Strain RW1. *App. Environ. Microbiol.*, v. 58, n. 3, p. 1005-1010, 1992.
- WRABEL, M. L.; PECKOL, P. Effects of bioremediation on toxicity and chemical composition of n° 2 fuel oil: growth responses of the brown algae *Fucus vesiculosus*. *Marine Pollution Bulletin.*, v. 40, n. 2, p. 135-19, 2000.
- WU, W. Z.; XU, Y.; SCHRAMM, K. W.; KETTRUP, A. Persistence of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans (PCDD/Fs) in Ya-Er Lake Area, China. *Environm. Internat.*, v.26, p.323-326, 2001.
- XU, F. Oxidation of phenols, anilines and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials ace well ace halide inhibition. *Biochemistry*, v. 35, p. 7608-, 1996.

Errata

1-) Basidiomicetes = basidiomicetos

2-) Página 14

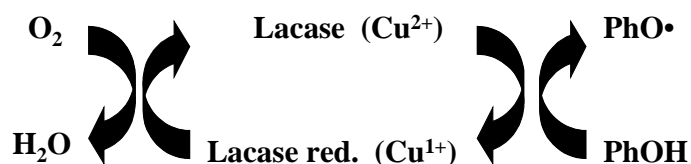


Figura 2.5 Representação de uma reação catalisada por lacase. PhOH representa um substrato fenólico.

3-) Pagina 22: Quarto parágrafo 2,08nh I-TEQ/kg = 2,08 ng I-TEQ/kg

3-) Página 30

110,88 mg/L = 110,88 µg/L

4-) Página 42

O mesmo comportamento ocasionado pelo aumento da quantidade de cinzas adicionadas ao meio de cultivo também foi verificado para as linhagens *Agaricus campestris*, *Pleurotus sajor- caju* e *Phanerochaete chrysosporium*. Para as linhagens *Pleurotus* sp. CCB 068, *Pleurotus sajor - caju* 020 e *Pleurotus* sp PSC 94/03, a adição de 70g/L não favoreceu o aumento da atividade de LiP em todo o período avaliado.

5-) Página 44

De um modo geral , verificou-se que o aumento da concentração de cinzas no meio de cultivo , de 50 g/L para 70 g/L, favoreceu o aumento na produção da atividade de LiP para a maioria das linhagens.

6-) Página 69

Pleurotus sordida = *Phanerochaete sordida*